

Einfluß der Sauerstoffversorgung
auf das Membranpotential und die
intercelluläre elektrische Koppelung
von Hepatocyten

von

Jens Höper
aus Stockelsdorf

Diss.
Erlangen
1984

1985 № 23

Aus dem Institut für Physiologie und Kardiologie
der Universität Erlangen - Nürnberg
Vorstand: Professor Dr. M. Kessler

Einfluß der Sauerstoffversorgung auf das Membranpotential und die intercelluläre elektrische Koppelung von Hepatocyten

Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen - Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Jens Höper
aus Stockelsdorf

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaftlichen
Fakultäten der Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung:

27.11.1984

Vorsitzender der Promotionskommission:

Professor Dr. Jacobs

Erstberichterstatter:

Professor Dr. M. Kessler

Zweitberichterstatter:

Professor Dr. G. Seitz

I n h a l t s v e r z e i c h n i s

=====

	Seite
A. Einleitung	1
B. Methodik	6
B.1. Präparation und Perfusionstechnik	6
B.2. Messung von Sauerstoffpartialdrucken	6
B.3. Herstellung der Glasmikroelektroden	7
B.4. Verstärker	9
B.5. Widerstandmessungen	11
B.5.1. Bestimmung des scheinbaren Membranwiderstandes R_M	11
B.5.2. Bestimmung des scheinbaren Längswiderstandes	15
B.6. Bestimmung der intrazellulären elektrischen Koppelung	15
B.7. Registrierung und Auswertung der Daten	18
B.8. Statistische Auswertung	21
C. Ergebnisse	22
C.1. Sauerstoffmessungen	22
C.2. Membranpotential	25
C.2.1. Verteilung der Membranpotentiale	25
C.2.2. Einfluß einer Kurzzeithypoxie auf das Membranpotential	32
C.3. Bestimmung des scheinbaren Membranwiderstandes R_M	39
C.4. Bestimmung der interzellulären elektrischen Koppelung	46

	Seite	
D.	Diskussion	53
D.1.	Verteilung der Membranpotentiale	53
D.2.	Wirkung des Noradrenalins auf das Membranpotential	56
D.3.	Einfluß einer Hypoxie auf das Membranpotential	60
D.4.	Bestimmung des scheinbaren Membranwiderstandes R_M	63
D.5.	Intercelluläre elektrische Koppelung	67
E.	Zusammenfassung	76
	Tabellen	78
	Literaturverzeichnis	84

A. EINLEITUNG

Die lokale Sauerstoffversorgung scheint in allen Organen homoiothermer Tiere sehr effizient geregelt zu sein (Kessler et al. 1976, Kessler et al. 1977). Hypoxie sowie ein gesteigerter Sauerstoffverbrauch führen zu einer Steigerung der Organdurchblutung und damit zumindest zu einer partiellen Kompensation des Ungleichgewichtes zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf (Scholtholt 1970, Grote et al. 1973, Adachi et al. 1976, Leniger-Follert und Lübbers 1976, Leniger-Follert et al. 1978, Wiedemann et al. 1979).

Als Auslöser für die Durchblutungsänderung werden verschiedene Substanzen diskutiert, z.B. Wasserstoffionen, Kaliumionen und Adenosin (Berne und Rubio 1974, Betz et al. 1976, Grote et al. 1973, Leniger-Follert et al. 1978).

Alle diese Stoffe müßten nach der klassischen Auffassung entgegen der Durchblutungsrichtung zu den Gefäßen gelangen, die dann durch Vasodilatation eine Mehrdurchblutung zulassen. Auf dieses Problem wies auch Lübbers (1982) hin.

Duling (1972, Gorczynsky und Duling 1977) konnte zeigen, daß in der Skelettmuskulatur bereits eine kompensatorische Mehrdurchblutung einsetzt, bevor lokale Anoxien auftreten, d.h. die Regulation ist offenbar nicht abhängig vom anoxiebedingten Entstehen von Stoffwechselendprodukten oder vom Austritt von Kalium aus den Muskelzellen infolge Energiemangels, sondern scheint durch die Gewebeoxygenierung beeinflußt zu sein. Untersuchungen von Höper und Kessler (1981) ergaben, daß wahrscheinlich Monoaminoxidase-B in diesen Regelmechanismus involviert ist, der möglicherweise über interzelluläre Signalketten auf die regulierenden Strukturen einwirkt (Kessler et al. 1984). Untersuchungen von Höper und Kessler (1978a) haben gezeigt, daß sauerstoffabhängige kompensatorische Durchblutungsänderungen auch an der isoliert perfundierten Rattenleber induziert werden können.

Dieser Regulationsmechanismus ist abhängig von der Anwesenheit von Noradrenalin und Natrium im Extrazellulärraum. Noradrenalin bewirkt über eine alpha-adrenerge Reaktion offenbar einen Natriuminflux in die Leberparenchymzellen und eine Vaskonstriktion. Eine Erniedrigung des Sauerstoffpartialdruckes führt zu einer Umkehr dieser Vorgänge. Aus den gemessenen Änderungen der extracellulären Ionenaktivitäten läßt sich ableiten, daß beide Reaktionen mit einer Änderung des Membranpotentials einhergehen.

Offensichtlich wird die alpha-adrenerge Wirkung des Noradrenalins durch die Gewebeoxygenierung moduliert. Der genaue Mechanismus der alpha-adrenergen Stimulation ist bis heute nicht bekannt (Exton, 1980).

Während sich eine Reihe von Untersuchungen mit dem Einfluß verschiedener Ionen sowie unterschiedlicher Membranpermeabilitäten auf das Membranpotential von Hepatocyten befassen, wurde nur von wenigen Autoren der Einfluß von Hormonen, z.B. Katecholaminen, auf bioelektrische Phänomene an diesen Zellen näher untersucht. Diese letzteren können in 2 Gruppen untersucht werden:

1. Untersuchung der Katecholaminwirkung auf das intakte Organ (in situ Untersuchungen und Messungen an der perfundierten Leber).
2. Untersuchungen der Hormonwirkung auf Gewebeschnitte und Einzelzellen.

Zwischen diesen beiden Versuchsansätzen gibt es offensichtlich substantielle Unterschiede der Wirkung von Katecholaminen: An der Leber in situ sowie am perfundierten Organ bewirkt die Stimulation der alpha-Adrenoceptoren eine Depolarisation (Lambotte 1973, Orozco und Sabelli 1970), die Stimulation der beta-Adrenoceptoren eine Hyperpolarisation (Lambotte 1973) der Plasmamembran während in Gewebeschnitten beide eine Hyperpolarisation auslösen (Haylett und Jenkinson 1972 a,b). Lambotte (1973) nimmt an, daß die alpha-Rezeptorstimulation hauptsächlich eine Zunahme der Natriumpermeabilität (P_{Na}) und einen Natriumeinstrom bewirkt, während

Haylett und Jenkinson (1972 a,b) eine Zunahme der Kaliumpermeabilität (P_K) und einen Kaliumefflux finden. Wesentliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Modellen, deren Bedeutung bisher nicht näher analysiert wurde, sind zum einen, daß die isolierten Organe hormonell "amputiert" sind und daß die Innervation entfällt und zum anderen, daß die Versorgungs- und Entsorgungsbedingungen sehr unterschiedlich sind. Die Untersuchungen von Lambotte (1973), der die Organe mit homologem Blut perfundierte, könnten einen Hinweis darauf geben, daß Blutbestandteile (z.B. Hormone) das Membranpotential der Hepatocyten modulieren.

Die Versorgungs- bzw. Entsorgungsbedingungen unterscheiden sich vor allen Dingen in zwei wesentlichen Punkten: In den isolierten hämoglobinfrei perfundierten Organen und in den Schnitten liegen sehr hohe Sauerstoffpartialdrucke vor, da die Perfusionsmedien und Badlösungen mit Gasgemischen äquilibriert werden, die 95-97% Sauerstoff enthalten (Claret und Mazet 1972, Egashira 1980, Haylett und Jenkinson 1972a, Heller und van der Kloot 1974, Kolb und Adam 1976, Lambotte 1973, Mazet et al. 1974, McLean 1963, Sayeed and Baue 1973). Der Abtransport von Stoffwechselprodukten ist in Gewebeschnitten weitgehend eingeschränkt, da hier die konvektive Transportkomponente durch die Durchblutung entfällt.

An solchen, offenbar alterierten Präparaten kann die von uns (Kessler et al. 1981b, Kessler et al. 1984) entwickelte Hypothese der sauerstoffabhängigen Regulation der Mikrozirkulation und der Organdurchblutung nicht überprüft werden. Diese Hypothese beruht auf folgenden experimentellen Ergebnissen: Eine Durchblutungsänderung tritt bereits ein, bevor eine Anoxie im Gewebe meßbar ist, d.h. der K_{mO_2} des beteiligten sauerstoffabhängigen Schrittes liegt offenbar über dem des Cytochrom aa₃. Zumindest in der Leber ist wahrscheinlich eine Monoaminoxidase-B das beteiligte Enzym. Die völlige Inhibierung dieser Oxidase bewirkt eine Zunahme der Organdurchströmung mit einer simultanen Änderung der extrazellulären Natriumaktivität (Höper, Kessler 1981). Allerdings hat auch eine teilweise Blockierung des Enzyms schon eine Wirkung auf die Perfusion, in diesem Fall

kommt es nicht zu ausgeprägten ionalen Veränderungen. Eine partielle, lokale Inhibierung der Monoaminoxidase tritt auch bei Unterschreitung eines lokalen Sauerstoffpartialdruckes ca. 3-5 mmHg ein. Dieser Zustand wird im folgenden als Hypoxie bezeichnet. Der Einfluß einer solchen kurzzeitigen Hypoxie auf das Membranpotential der Hepatocyten wurde bisher nicht untersucht. Darüberhinaus konnte bisher nicht eindeutig entschieden werden, auf welchem Wege eine lokale Hypoxie die Durchblutung beeinflußt bzw. welche Form der "Kommunikation" zwischen Parenchymzellen und Gefäßstrukturen besteht. Die von uns (Kessler et al. 1984) vorgeschlagene Hypothese geht davon aus, daß unter der Bedingung einer Hypoxie eine "Signalübermittlung" über interzelluläre Verbindungen erfolgt. In der Leber ist eine "Signalfortleitung" über "gap junctions" möglich. Wie Loewenstein (1966) in seinen klassischen Versuchen zeigen konnte, sind die gap junctions Strukturen mit niedrigem elektrischen Widerstand. Penn (1966) konnte erstmals nachweisen, daß auch Hepatocyten elektrisch gekoppelt sind.

Loewenstein (1978) konnte darüberhinaus den Beweis führen, daß diese Strukturen nicht nur für Ionen, sondern auch für größere Moleküle durchlässig sind. Der Autor nimmt an, daß diese Verbindungen Bedeutung haben für die Kontrolle von Wachstum und Differenzierung, aber auch für die "Abkoppelung" von defekten Zellen von ihren intakten Nachbarn.

Loewenstein und Mitarbeiter (Loewenstein et al. 1978) wiesen nach, daß die Koppelung zwischen den Zellen, d.h. die Permeabilität der "gap junctions" abhängig ist von der intrazellulären Calcium-Aktivität. Eine solche Calcium-abhängige Änderung der interzellulären Koppelung könnte eine Bedeutung für die Signalübermittlung bei der Durchblutungsregulation haben.

Die vorliegende Arbeit versucht einige Aspekte der sauerstoff-abhängigen Durchblutungsregulation zu beschreiben:

1. Gibt es in der Rattenleber einen Mechanismus, der in die Fortleitung von spezifischen Signalen, die bei Senkung des Gewebe- pO_2 auftreten, involviert ist ?

2. Spielen bei der Signalübermittlung elektrophysiologische Mechanismen eine Rolle ?
3. Wird die elektrische Koppelung der Hepatocyten durch die Gewebeoxygenierung beeinflußt ?

B. METHODIK

B.1. Präparation und Perfusionstechnik

Die Untersuchungen wurden an Lebern von Wistar-Ratten beiderlei Geschlechts durchgeführt (eigene Nachzucht von Wistar - AF - Ratten, Institut für Versuchstierzucht, Hannover). Das Gewicht der Tiere betrug 180-200 g. Die Tiere wurden mit 6 mg Nembutal/100g i.p. (Pentobarbital-Natrium) narkotisiert. Eine intravasale Blutgerinnung wurde mit einer intravenösen Injektion von 100 I.E. Heparin/100g verhindert. Das Lebergewicht betrug $11,6 \pm 2,6$ g.

Die Präparation der Leber erfolgte in Anlehnung an Miller et al. (1951). Die V. porta und die V. cava wurden mit einem Polyäthylenkatheter kanüliert. Durch den Katheter in der Pfortader wurden die Organe durchströmt. Die rezirkulierende Perfusion erfolgte nach der von Höper und Kessler beschriebenen Methode (in Vorbereitung). Als Perfusionsmedium fand eine Krebs-Ringer-Henseleit-Lösung mit einem Zusatz von 35 g Albumin/l Verwendung. Das Perfusionsmedium wurde mit einem Gasgemisch aus 95% O_2 und 5% CO_2 (normoxische Perfusion) oder einem Gemisch aus 95% N_2 und 5% CO_2 (hypoxische Perfusion) äquilibriert.

Das pH betrug $7,41 \pm 0,05$.

B.2 Messung von Sauerstoffpartialdrucken

Die Sauerstoffpartialdrucke im zufließenden Perfusionsmedium und im Gewebe wurden polarographisch mit Platinelektroden vom Clark-Typ gemessen (Heyrovski 1948, Clark et al. 1953).

Das zugrundeliegende Prinzip der polarographischen Sauerstoffmessung ist die elektrochemische Reduktion von Sauerstoffmolekülen an einer polarisierten Edelmetalloberfläche. Zwischen der Platinelektrode (Kathode) und einer Ag/AgCl-Elektrode (Anode) wird eine Spannung, die Polarisierungsspannung, angelegt. Verändert man die Spannung, so zeigt sich, daß der Strom zwischen ca. 400 mV und ca. 800 mV unabhängig von der angelegten Spannung ist. In diesem Bereich ist die Stromstärke abhängig von der Anzahl der an der Kathode reduzierten Sauerstoffmoleküle. Diese wird bestimmt durch den Sauerstoffpartialdruck im Meßmedium und die Diffusionsleitfähigkeit der Elektrodenmembranen.

Für die pO_2 -Messung fanden 2 Elektroden Verwendung. Im Perfusat erfolgte die Messung des Sauerstoffpartialdruckes mit einer Durchflußelektrode, der pO_2 im Gewebe wurde mit einer Mehrdrahtoberflächenelektrode (MDO) bestimmt (Gleichmann und Lübbers, 1960, Kessler und Lübbers, 1966, Kessler und Grunewald, 1969). Beide Elektrodentypen erhalten als Meßkathoden in Glas eingeschmolzene Platindrähte mit einem Durchmesser von 15 μm . Die katalytischen Oberflächen der Pt-Drähte sind mit einer 12.5 μm dicken Cuprophan- und einer 12.5 μm dicken Teflonmembran gegen das Meßmedium abgeschlossen.

Die Eichung der Elektroden erfolgte vor und nach dem Experiment mit 2 Eichgasen (95% N_2 + 5% CO_2 , 95% O_2 + 5% CO_2). In einem thermostatisierten Eichgefäß wurde Wasser mit diesen Gasen äquilibriert, in diesen Lösungen erfolgte die Eichung der Elektroden.

Zwischen dem meßbaren Reduktionsstrom und dem Sauerstoffpartialdruck besteht eine lineare Beziehung. Der Nullstrom in einem sauerstofffreien Medium beträgt ca. 0,1 nA, die Empfindlichkeit 0.01 nA/Torr. Die Drift betrug ca. 5%/h und wurde bei der Auswertung berücksichtigt. Die Einstellzeit der Elektroden beträgt ca. 5 sec für 90% des Endwertes.

B.3. Herstellung der Glasmikroelektroden

Die Messung der Membranpotentiale erfolgte mit Glasmikroelektroden. Diese Elektroden wurden aus Glaskapillaren mit Filament (Clark Electromedical Instruments, GC200F-6) mit einem modifizierten Ziehgerät (Getra, München, Abbildung 1, horizontaler Zug) gezogen. Um eine hohe Temperaturkonstanz zu erreichen ist der Puller mit einem Plexiglasgehäuse umgeben, die Halterung der Heizschlinge vermindert die Wärmeableitung über metallische Verbindungen.

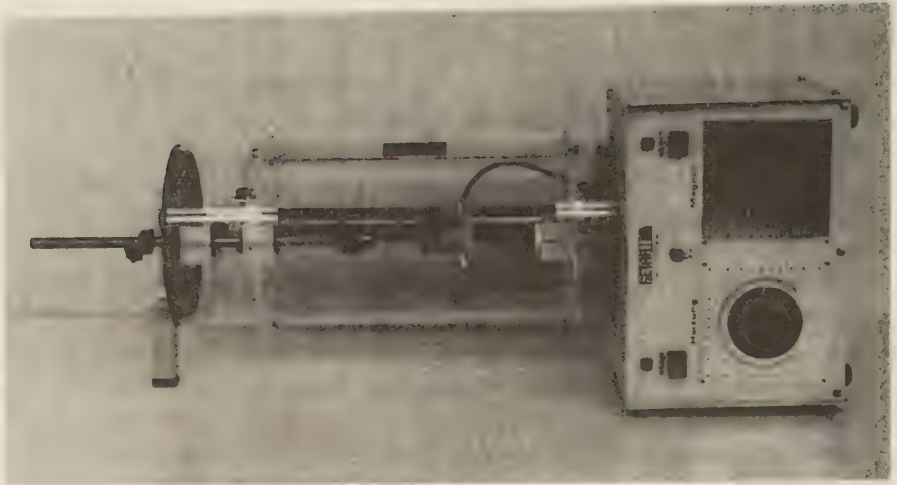


Abb.1.
Modifizierter Puller mit Plexiglasgehäuse

Die gewünschte Form der Spitze wurde durch entsprechende Einstellung des Magnetzuges und der Heizung erzielt. Der Spitzendurchmesser betrug $< 1\mu\text{m}$ (Abbildung 2).



Abb.2.
Glasmikroelektrode
A: Übersichtsaufnahme
B: Vergrößerung der Elektrodenspitze. Der Maßstab entspricht $1\mu\text{m}$.

Die Mikroelektroden wurden mit 3 M KCl-Lösung luftblasenfrei gefüllt. Ein chlorierter Silberdraht, der in die Kaliumchloridlösung tauchte, vermittelte den Übergang von der Füllflüssigkeit auf die Zuleitung zum Verstärker. Vor jedem Versuch wurde der Elektrodenwiderstand geprüft und es fanden nur Elektroden mit einem Widerstand > 10 Megohm Verwendung.

Die tip-Potentiale dieser Elektroden betrugen 8 ± 3 mV. Als indifferente Elektrode diente eine Ag/AgCl-Elektrode, die über eine Elektrolytbrücke mit dem Organ verbunden war. Die 2-Kanal-Mikroelektroden für die simultane Strominjektion und die Messung des Membranpotentials wurden mit dem gleichen Elektrodenziehgerätaus Theta-Kapillaren (Clark Elektromedical Instruments, IGC 200-10) hergestellt. Diese Elektroden wurden ebenfalls mit 3 M KCl gefüllt.

B.4 Verstärker

Der in die Elektrolytlösung (3 M KCl) eingeführte chlorierte Silberdraht war über eine aktiv abgeschirmte Zuleitung mit dem Verstärker verbunden. Abbildung 3 gibt den Schaltplan der verwendeten Meßeinrichtung wieder.

Der eigentliche Verstärker besteht aus einem Impedanzwandler mit einer nachgeschalteten Verstärkerstufe. Das Meßsignal wird 10fach verstärkt. Der Eingangswiderstand ist $> 10^{11}$ Ohm. (Einheit C in Abbildung 3).

Über einen Injektionswiderstand R_{Inj} (B in Abbildung 3) kann ein Frequenzgenerator (Hewlett-Packard) angeschlossen werden. Der Injektionswiderstand R_{Inj} beträgt $9,1 \times 10^8$ Ohm ($\pm 1\%$).

Wichen die im Extrazellulärraum gemessenen Potentiale von den in KCl-Lösung bestimmten tip-Potentialen ab, so wurde ein Abgleich mit dem Kompensationsteil (A in Abbildung 3) durchgeführt.

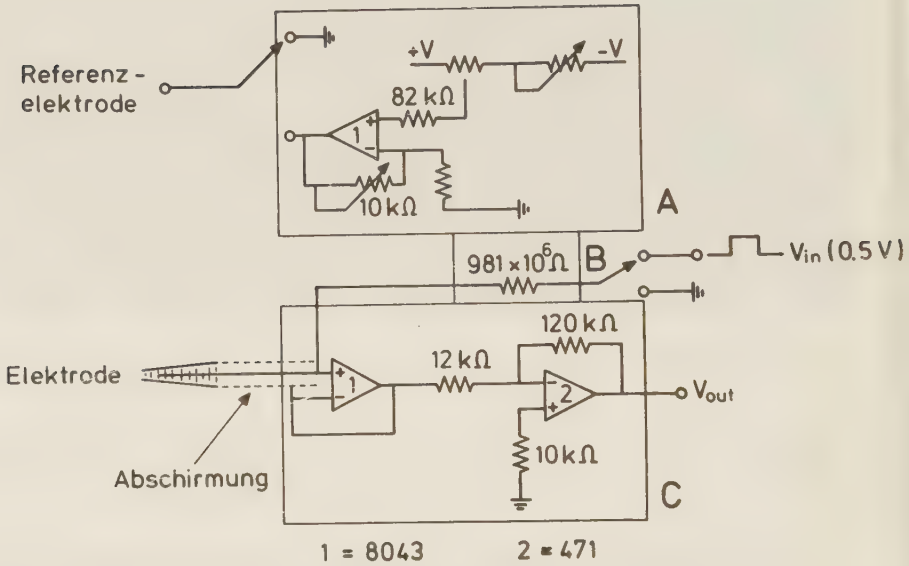


Abb.3.

Schaltplan des Verstärkers

A: Spannungskompensation

B: Injektionswiderstand R_{Inj}

C: Verstärkerteil *

*Ich danke Dr.S.Razmjoo, Universität Bochum, Institut für Tierphysiologie, für die Überlassung des Schaltplanes.

B.5 Widerstandsmessungen

B.5.1. Bestimmung des scheinbaren Membranwiderstandes R_M

Über einen Injektionswiderstand R_{Inj} wurde ein Rechteckspannungspuls von 500 mV eingespeist. Die zwischen dem Injektionswiderstand und der Elektrode abgegriffene Spannung ist abhängig vom Widerstand der Elektrode R_E . Bei bekannter Spannung V_{in} und gemessener Spannung V_{out} kann der Widerstand R_E unter Berücksichtigung der Verstärkung folgendermaßen berechnet werden:

$$R_E = \frac{(V_{out} \times 10^{-1}) \times 9,1 \times 10^8}{V_{in} - (V_{out} \times 10^{-1})}$$

Mit hochpräzisen Widerständen ($\pm 1\%$) wurde eine Eichkurve aufgestellt (Abbildung 4).

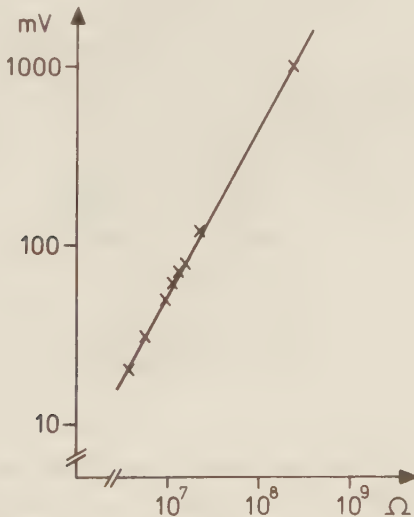


Abb.4.

Eichkurve für die Bestimmung des Widerstandes R_E . Der Korrelationskoeffizient beträgt $r = 0,9996$.

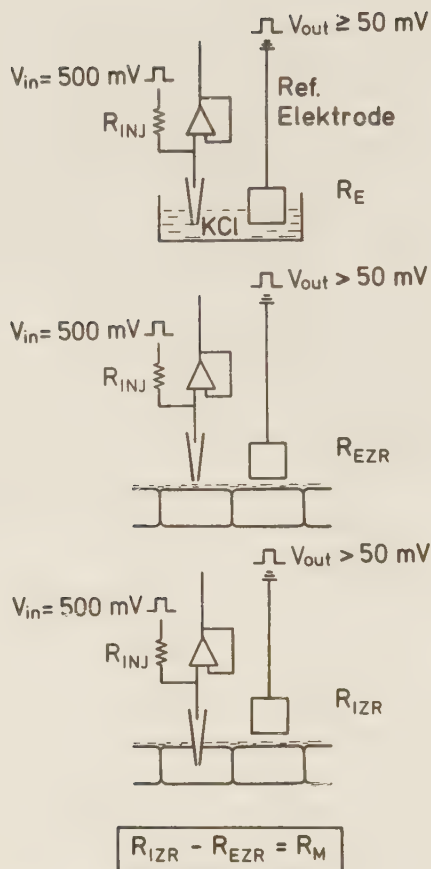


Abb.5.

Schematische Darstellung der Messung des scheinbaren Membranwiderstandes R_M . Zunächst wurde der Elektrodenwiderstand R_E bestimmt, danach wurde die Elektrode auf die Organoberfläche aufgesetzt und der Widerstand R_{EZR} gemessen. Dieser setzt sich zusammen aus dem Widerstand der Elektrode und dem Widerstand des extrazellulären Raumes. Nachdem die Elektrode in die Zelle eingestochen war, konnte der Widerstand R_{IZR} berechnet werden. Die Differenz $R_{IZR} - R_{EZR}$ ergibt den Widerstand R_M .

Mit dieser Einrichtung wurde der Widerstand der Elektroden, der Widerstand im Extrazellulärraum und der Widerstand nach Einstich in die Zelle bestimmt. Aus der Differenz des Widerstandes im Extrazellulärraum (R_{EZR}) und dem Widerstand bei intrazellulärer Messung (R_{IZR}) wurde der scheinbare Membranwiderstand R_M berechnet (siehe Abbildung 5).

Die Breite des Rechteckimpulses betrug 200 msec, während dieser Zeit wurde ein konstanter Spannungswert sowohl in der KCl-Lösung wie auch bei intrazellulärer Messung erreicht, so daß Kapazitätseinflüsse vernachlässigt werden konnten (Abbildung 6).

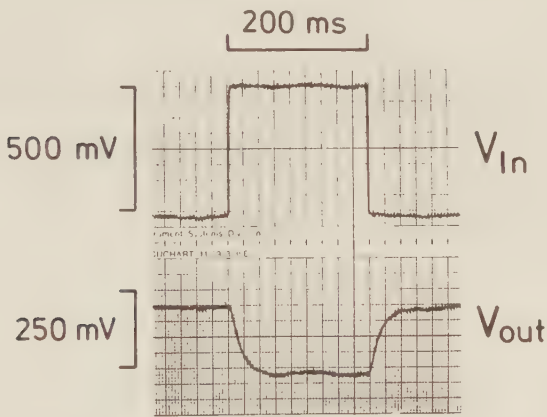


Abb.6.

Originalregistrierung der Spannung V_{in} (oben) und V_{out} während intracellulärer Messung zur Bestimmung des Widerstandes R_M . Die Pulsbreite beträgt 200 msec.

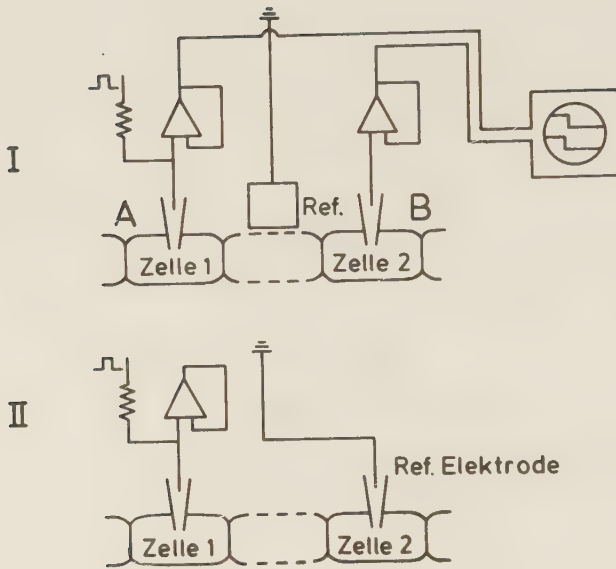


Abb.7.

Bestimmung des scheinbaren Längswiderstandes R_L .

Zunächst werden die Elektroden unter Kontrolle am Oszillographen in die Zellen 1 und 2 eingestochen (I). Danach wird die Elektrode B als Referenzelektrode geschaltet (II). Über den Widerstand R_{Inj} am Verstärker der Elektrode A wird ein Spannungspuls V_{in} von 500 mV eingespeist und aus der gemessenen Spannung V_{out} der scheinbare Längswiderstand R_L berechnet.

B.5.2. Bestimmung des scheinbaren Längswiderstandes

Für die Messung des scheinbaren Längswiderstandes wurden, unter Kontrolle am Oszillographen, in zwei Zellen je eine einfache Mikroelektrode eingestochen (A und B in Abbildung 7). Zunächst wurden die Membranpotentiale gegen die extrazellulär befindliche indifferente Elektrode bestimmt. Danach wurde eine Mikroelektrode (B in Abbildung 7) als indifferente Elektrode geschaltet. Über den Injektionswiderstand am Verstärker der Elektrode A wurde, wie oben beschrieben, ein Rechteckspannungspuls gegeben. Aus dem Meßsignal konnte die Änderung des scheinbaren Längswiderstandes bestimmt werden.

B.6. Bestimmung der interzellulären elektrischen Koppelung

Für die Bestimmung der interzellulären elektrischen Koppelung wurden zwei Zellen im Abstand von ca. 500 μm unter mikroskopischer Beobachtung punktiert, eine Zelle mit einer double-barrel-Elektrode und eine zweite Zelle mit einer einfachen Glasmikroelektrode.

In Abbildung 8 ist der Versuchsaufbau gezeigt. Die Elektroden wurden mit hydraulischen Mikromanipulatoren (David-Kopf-Instruments,) eingestochen. Die kleinste Schrittweite beträgt bei diesen Geräten 1 μm . Die Genauigkeit wurde mikroskopisch mit Hilfe eines Objekt- und eines Okularmikrometers überprüft. Während des Vortriebes betrug ein Einzelschritt $1,001 \pm 0,06 \mu\text{m}$ ($n=10000$), während des Zurückziehens $0,957 \pm 0,04 \mu\text{m}$ ($n=10000$). Während einer Zeitdauer von 60 min. änderte sich die Position der Elektroden nicht.

Über einen Kanal der double-barrel-Elektrode wurde ein Strom von 5×10^{-8} Ampere injiziert, über den zweiten Kanal dieser Elektrode wurde die in dieser Zelle induzierte Spannungsänderung V_1 gemessen. In der zweiten Zelle wurde die sich elektrotisch ausbreitende Spannungsänderung V_2 gemessen. Eine schematische Darstellung des Meßaufbaues ist in Abbildung 9 wiedergegeben.

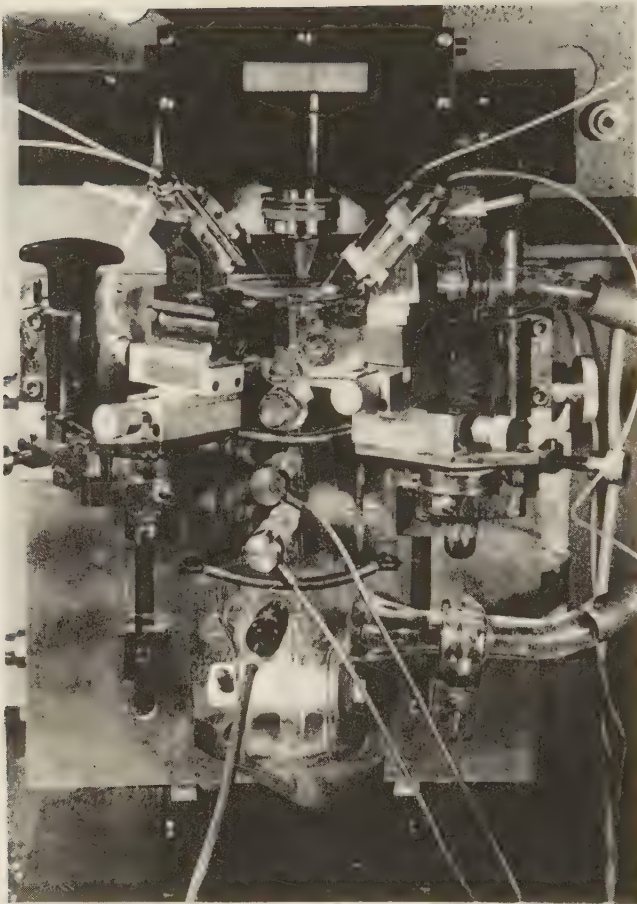


Abb.8.

Thermostatisiertes Glasgefäß zur Aufnahme der isolierten Leber.
Die Pfeile zeigen auf die Elektrodenhalterungen der hydraulischen
Mikromanipulatoren.

Im oberen Teil der Abbildung ist die Optik des Auflichtmikroskopes
zu erkennen.

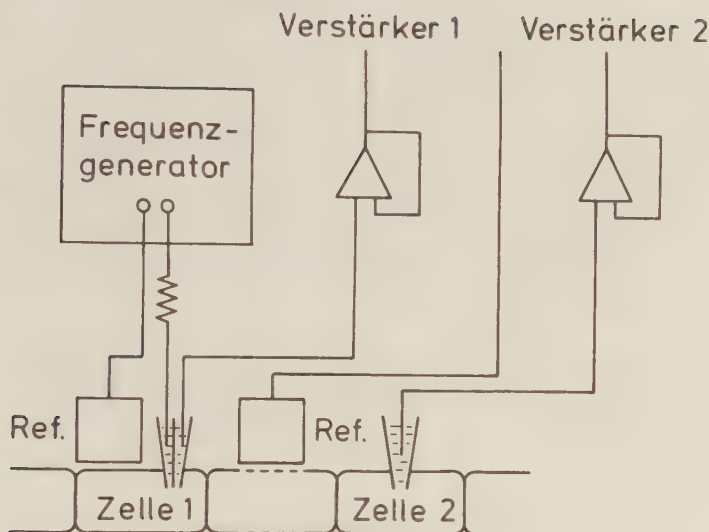


Abb.9.

Bestimmung der intercellulären elektrischen Koppelung. Über einen Kanal der double-barrel-Elektrode in Zelle 1 wird ein Strom von $5 \times 10^{-8} \text{ A}$ injiziert. Der Frequenzgenerator ist über einen Trenntransformator an die Stromversorgung angeschlossen. Der Stromfluß erfolgt zwischen der double-barrel-Elektrode und der Referenzelektrode am Frequenzgenerator. Die Messung der induzierten Spannungsänderung V_1 (Verstärker 1) erfolgt, ebenso wie die Messung der Spannungsänderung V_2 (Verstärker 2) gegen eine zweite Referenzelektrode.

B.7. Registrierung und Auswertung der Daten

Eine schematische Übersichtsdarstellung der Meß- und Registrier-einrichtung ist in Abbildung 10 gezeigt. Die digitale Speicherung der Ausgangsspannungen der pO_2 -Verstärker erfolgte, ebenso wie die des Reizsignals, mit einer Rechenanlage (DEC LSI 11/2) auf einer Floppy-Disc.

Die Signale der Mikroelektrodenmessungen wurden auf einem Oszillographen (Tektronix) dargestellt. Daneben erfolgte eine direkte Registrierung mit einem XY-Schreiber (Hewlett-Packard) und ebenfalls eine digitale Speicherung mit der Rechenanlage. Die Datenerfassung und -auswertung mit der Rechenanlage erfolgte mit dem von Brunner et al. (in Druck) beschriebenen Programm DIG V1.3. Die Datenerfassung wurde mit einer Digitalisierungsrate von 100 Hz durchgeführt.

Mit Hilfe eines zusätzlichen Programmes konnte die Pulshöhe der Strompulse und der Spannungsänderungen bestimmt werden. Der Algorithmus zur Auffindung von Pulsen gliedert sich in zwei Teile:

1. Lernphase:

Zu erlernender Parameter: Schwelle zwischen Puls und pulsfreiem Intervall. Bedingung: im Lernzeitraum muß genau ein Puls vorkommen. Der Zeitraum wird solange verschoben, bis die Bedingung erfüllt ist. Die zunächst vorgegebene Schwelle beträgt 1 Bit. Je nach eingestellter A/D-Wandler-verstärkung entspricht ein Bit 0,61, 1,22, 2,44 oder 4,88 mV. Da die Signale bereits 10fach verstärkt wurden, beträgt die kleinste erfaßbare Änderung des Membranpotentials 0,06 mV. Mit dieser Schwelle wird im Lernzeitraum der am besten passende Puls gesucht, d.h. der Puls, der die Bedingung der vorgegebenen Mindestpulsdauer erfüllt und die größte Schwelle gewährleistet. Für die Berechnung werden die Werte des pulsfreien Intervalls ersetzt durch die Regressionsgerade dieser Intervallwerte, und die Werte des Pulses durch die Regressionsgerade der Pulswerte. Die daraus berechnete neue Schwelle ist der Mittelwert zwischen dem errechneten Wert zum Endzeitpunkt des Pulses und dem errechneten Wert zum Anfangszeitpunkt des Intervalls.

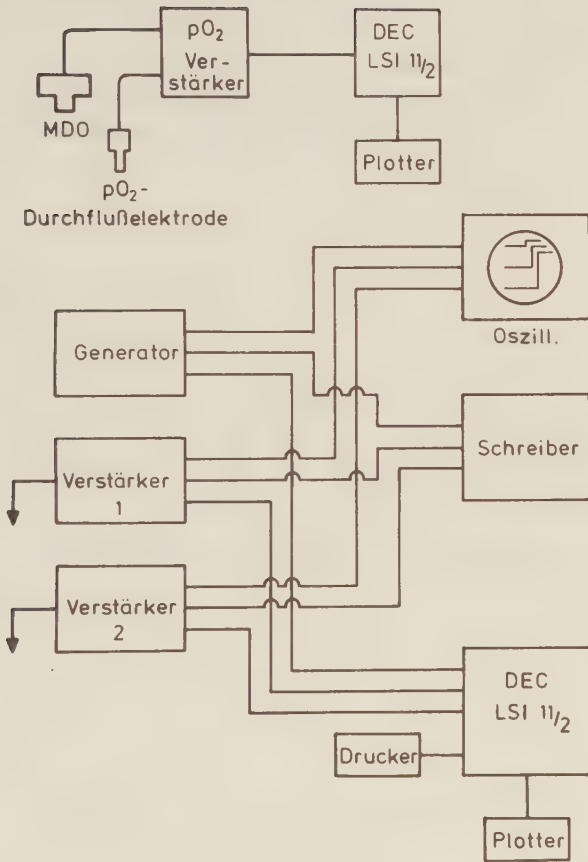


Abb.10.

Blockdiagramm der Meß- und Registriereinrichtung.

2. Anwendungsphase:

Anhand der vorgegebenen Mindestintervalldauer und der aktuellen Schwelle kann ein neuer Puls gefunden werden. Wie in der Lernphase werden die Werte korrigiert und die Schwelle wird dynamisch umdefiniert.

Als Ausgabeparameter erhält man die Pulsnummer, die Pulsanfangszeit und die Pulshöhe in mV. Eine schematische Darstellung des Verfahrens ist in Abbildung 11 gezeigt. Alle berechneten Werte wurden entweder als Spannungswert ausgedruckt oder mit einem Plotter (Benson 1102) gezeichnet.

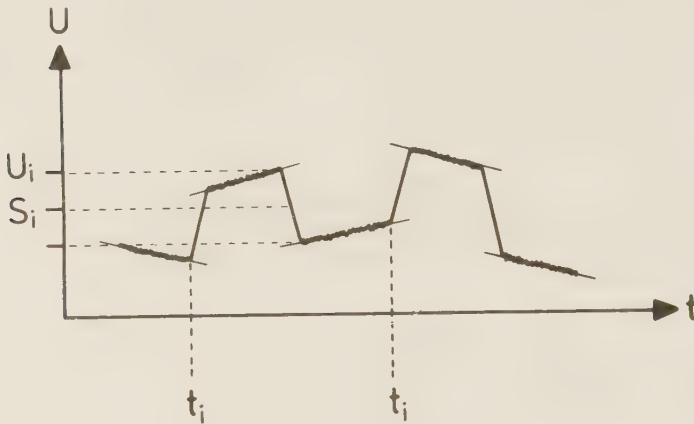


Abb.11.

Schematische Darstellung von 2 Pulsen. Die eingezeichneten Geraden entsprechen den berechneten Regressionsgeraden.

t_i = Pulsanfangszeit, S_i = Schwelle, U_i = Pulshöhe.

B.8. Statistische Auswertung

Die Überprüfung der Differenz (d) zwischen paarweise aufgeteilten Gruppen erfolgte mit der Formel (Haseloff, Hoffmann, 1968):

$$t = \frac{D}{\sqrt{\frac{\sum (d - D)^2}{n(n - 1)}}}$$

(D = Mittelwert der Differenzen zwischen n Paaren, d = Paardifferenzen, n = Anzahl der Paare).

Mit Hilfe dieses Tests wurde die Signifikanz der Membranpotentialänderung während der Hypoxiereaktionen geprüft.

Die Unterschiede zwischen verschiedenen Versuchsgruppen wurden mit dem Student-t-Test untersucht.

Der Chi-Quadrat-Test wurde für die Überprüfung der Unterschiede zwischen den Verteilungen der Membranpotentiale herangezogen.

Als Erwartungswerte wurden in beiden Versuchsgruppen (ohne und mit Noradrenalinapplikation) die Verteilungen der Membranpotentiale während Perfusion mit 1,9 mM Calcium festgesetzt. Bei der Untersuchung der Differenzen der Verteilungen ohne und mit Noradrenalin wurde jeweils die Kontrollgruppe (ohne Noradrenalin) als Erwartungswert herangezogen.

C. ERGEBNISSE

C.1. Sauerstoffmessungen

Die Sauerstoffversorgung der isolierten Organe wurde sowohl global wie auch lokal untersucht. Damit war eine Kontrolle des Sauerstoffangebotes und der lokalen Sauerstoffversorgung möglich. Für die weiteren Untersuchungen fanden nur Organe Verwendung, die keine Anzeichen einer gestörten lokalen O_2 -Versorgung aufwiesen.

Der Sauerstoffpartialdruck (pO_2) im zufließenden Perfusionsmedium betrug unter normoxischen Bedingungen $580,5 \pm 17,1$ mmHg. Während einer einminütigen hypoxischen Perfusion fiel der pO_2 des Perfusates auf $61,4 \pm 5,0$ mmHg ab. Bei einer Einstellzeit von 5 sec für 90% des Endwertes dürfte der tatsächliche pO_2 allerdings niedriger sein.

In Abbildung 12 (Tabelle 1) ist das Verhalten des Sauerstoffdruckes im Perfusat während einer einminütigen hypoxischen Perfusion dargestellt. Zum Zeitpunkt $t = 0$ sec wurde von einem mit Carbogen ($95\% O_2 + 5\% CO_2$) begasten Oxygenator auf einen mit einem Gemisch aus $95\% N_2 + 5\% CO_2$ begasten Oxygenator umgeschaltet, zum Zeitpunkt $t = 60$ sec erfolgte wieder Umschaltung auf den mit Carbogen begasten Oxygenator.

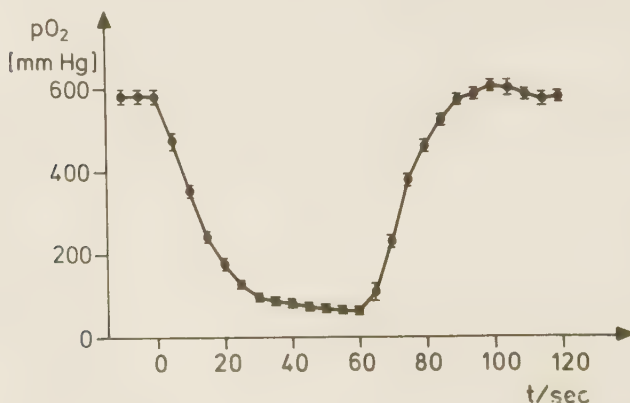


Abb.12:

Sauerstoffpartialdruck im Perfusionsmedium vor, während und nach hypoxischer Perfusion

($\bar{x} \pm S.D.$, $n = 65$)

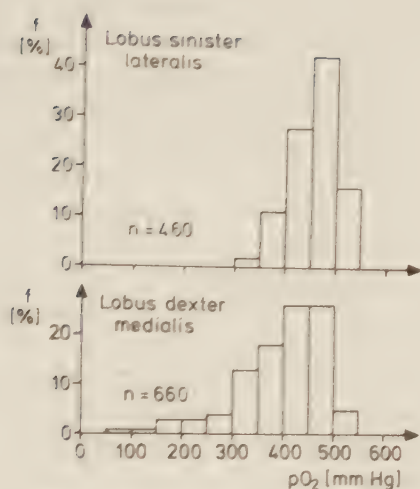


Abb.13.

Sauerstoffverteilungskurven im Lobus sinister lateralis (oben) und im Lobus dexter medialis (unten). Diese Werte wurden während der normoxischen Perfusion vor der Zugabe von Noradrenalin gemessen.

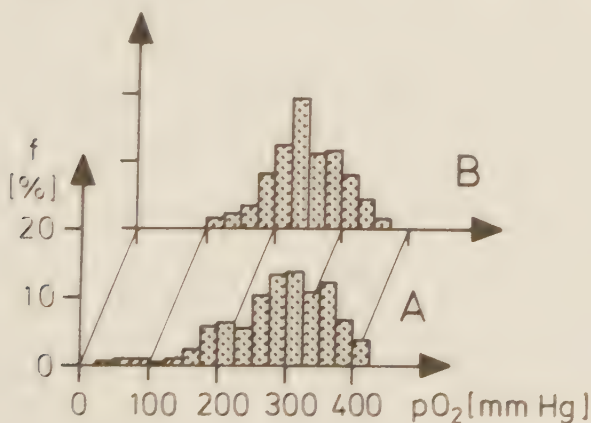


Abb.14.

Sauerstoffdruckverteilung im Lobus dexter medialis vor (A, n=400, und nach Zugabe (B, n=400) von $10^{-9}M$ Noradrenalin/L.

Bevor die Messungen mit Glasstichelektroden durchgeführt wurden, wurde die lokale Sauerstoffversorgung mit einer MDO untersucht. In Abbildung 13 sind die Sauerstoffdruckverteilungskurven (pO_2 -Histogramme) der beiden untersuchten Leberlappen (L. sinister lateralis, L. dexter medialis) dargestellt. Die niedrigsten lokalen pO_2 -Werte betrugen 302 bzw. 51 mmHg, die höchsten Werte liegen mit 548 bzw. 541 mmHg nahe am Zufluß- pO_2 . Die pO_2 -Histogramme zeigen eine linksschiefe Verteilung der Sauerstoffdruckwerte, lassen aber keine Disintegration erkennen. Diese Form der Verteilungskurven zeigt, daß keine Störungen der lokalen O_2 -Versorgung vorlagen und eine normale Verteilung der Mikrozirkulation bestand (Kessler et al. 1982).

In Abbildung 14 sind die pO_2 -Histogramme, gemessen im L. dexter medialis vor (A) und nach (B) Applikation von 10^{-9} M Noradrenalin/1 Perfusionsmedium, dargestellt. In diesen Experimenten betrug der niedrigste lokale pO_2 -Wert unter Kontrollbedingungen 48 mmHg. Nach Applikation von Noradrenalin wurden keine pO_2 -Werte unter 101 mmHg gefunden. Das Histogramm zeigt eine nahezu glockenförmige Verteilung der pO_2 -Werte. Sowohl der Anteil der niedrigen wie auch der Anteil der hohen pO_2 -Werte hat deutlich abgenommen (Tabelle 2).

C.2. Membranpotential

Die Membranpotentiale der Hepatocyten wurden unter verschiedenen Bedingungen gemessen. Organe, die ohne Noradrenalin im Perfusionsmedium durchströmt wurden, dienten als Kontrollen. In beiden Gruppen, Perfusion mit und ohne Noradrenalinapplikation, wurde die extrazelluläre Calciumkonzentration variiert, um den Einfluß dieses Ions auf das Membranpotential und auf die Noradrenalinwirkung zu prüfen.

C.2.1. Verteilung der Membranpotentiale

Die Untersuchung der Membranpotentiale erfolgte am Lobus sinister lateralis und am Lobus dexter medialis. Für die Auswertung wurden nur Messungen verwertet, die für mindestens 3 Minuten ein konstantes Potential ergaben. Unter Normalbedingungen (Calcium-Konzentration 1,9 mM) betrug der Mittelwert der gemessenen Potentiale -26 mV, die Standardabweichung 5,5 mV (n=237).

Die niedrigsten gemessenen Werte betrugen -11,5 mV, die höchsten -40,9 mV. Es ließ sich keine Zuordnung zwischen dem untersuchten Leberlappen oder der Einstichtiefe und den gemessenen Werten feststellen, d.h. es wurden sowohl an der Organoberfläche wie auch in der Tiefe (maximale Tiefe ca. 2mm) niedrige bzw. hohe Werte gefunden. Die Verteilungskurve der Membranpotentiale ist in Abbildung 15 dargestellt.

Die Veränderung der Calciumkonzentration im Perfusat hatte keinen signifikanten Einfluß auf das Membranpotential. Bei einem Calciumgehalt von 0,95 mM/l betrug der Mittelwert -29 mV, die Standardabweichung 7,2 mV (n=104). Unter dieser Bedingung betrug der niedrigste Wert -11,5 mV, der höchste -43,5 mV (Abbildung 16).

Nach Erhöhung der Calciumkonzentration auf 3,8 mM/l wurde die in Abbildung 17 dargestellte Verteilung der Membranpotentiale gefunden. Der Mittelwert betrug -28,5 mV, die Standardabweichung 9,7 mV (n=157). Das niedrigste Potential betrug -11,5 mV, das

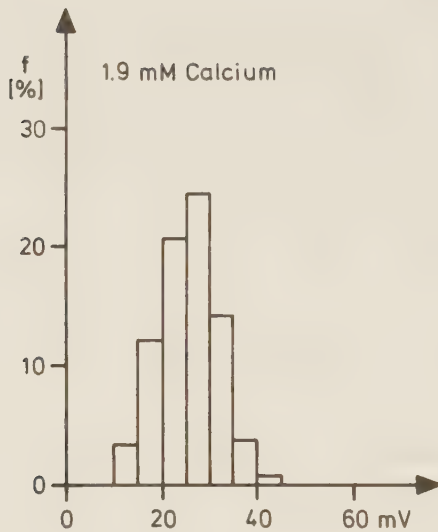


Abb.15.

Häufigkeitsverteilung der Membranpotentiale unter Kontrollbedingungen. Die Calciumkonzentration des Perfusates betrug 1,9 mM/l ($\bar{x} = -26$ mV, S.D. = 5,5 mV, $n=237$).

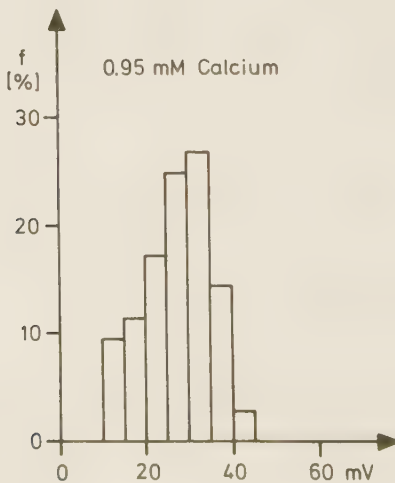


Abb.16.

Wie Abb.15. Die Calciumkonzentration betrug 0,95 mM/l ($\bar{x} = -29$ mV, S.D. = 7,2 mV, $n=104$).

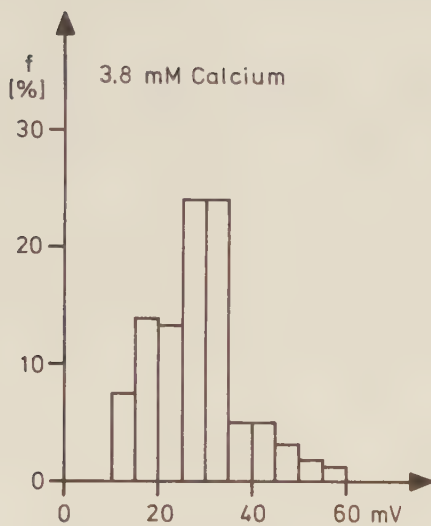


Abb.17.

Wie Abb.15. Die Calciumkonzentration betrug 3,8 mM/l.

($\bar{x}$ = -28,5 mV, S.D. = 9,7 mV, n= 157).

höchste -58 mV. Weder der Mittelwert noch die Verteilungen waren in diesen 3 Gruppen signifikant verschieden, d.h. das Calcium hatte im untersuchten Konzentrationsbereich keinen Einfluß auf das Membranpotential.

Nachdem von mindestens 5 Zellen ein stabiles Membranpotential gemessen war, wurde dem Perfusat Noradrenalin in einer Konzentration von 10^{-9} M/l zugesetzt. Diese NoradrenalinKonzentration bewirkt eine Zunahme des Gefäßwiderstandes und eine Abnahme der Organdurchströmung um im Mittel 15%.

Die "Durchblutungsänderung" ist verbunden mit einer Änderung des Organvolumens, es war deshalb sehr schwierig kontinuierlich den Effekt des Noradrenalins auf das Potential der Hepatocyten zu messen. Eine solche Messung ist nur in wenigen Zellen (n=5)

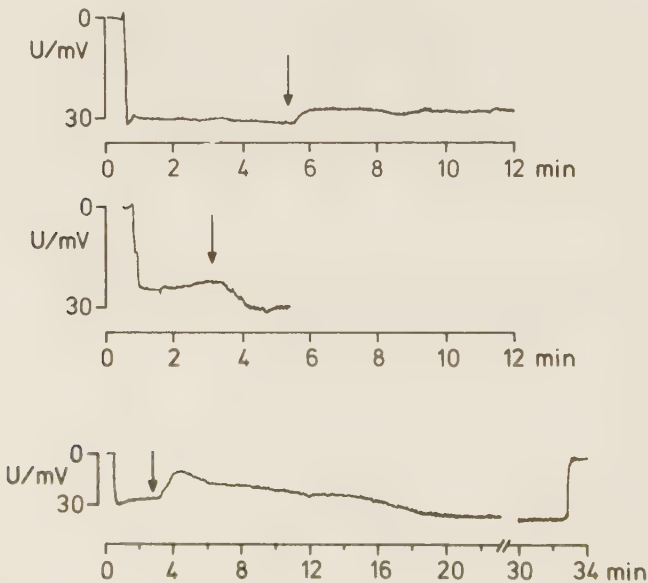


Abb.18:

Wirkung von Noradrenalin auf das Membranpotential. Die Pfeile markieren den Zeitpunkt der Noradrenalinzugabe (10^{-9} M Noradrenalin/l). Es wurden sowohl eine Depolarisation (obere Kurve) wie auch eine Hyperpolarisation (mittlere Kurve) beobachtet. In einem Fall wurde ein biphasischer Verlauf registriert (untere Kurve).

gelungen. In Abbildung 18 sind exemplarisch 3 Beispiele dargestellt. Wie aus der Abbildung 18 zu erkennen ist, wurden verschiedene Formen der Potentialänderung beobachtet. In insgesamt drei Zellen kam es zu einer Hyper- in einem Fall zu einer Depolarisation. In einem Fall wurde ein biphasischer Verlauf der Potentialänderung beobachtet. Zunächst kam es zu einer Depolarisation von maximal 17 mV, in einer zweiten Phase kam es, bezogen auf das Ausgangspotential, zu einer Hyperpolarisation von 6 mV.

Zwischen der fünften und der fünfzehnten Minute nach Zugabe von Noradrenalin wurde wieder die Verteilung der Membranpotentiale untersucht. Der Mittelwert veränderte sich, gegenüber den Ausgangsbedingungen nicht signifikant ($-25,7 \text{ mV} \pm 8,4 \text{ mV}$, 1,9 mM Calcium). Der niedrigste Wert betrug -7 mV , der höchste Wert -46 mV . Auch die Verteilung der Membranpotentiale änderte sich im Vergleich mit der Kontrollgruppe nicht signifikant (siehe Abb. 19), obwohl bei der kontinuierlichen Messung deutliche Änderungen der Membranpotentiale auftraten.

Eine Erniedrigung wie auch eine Erhöhung der extracellulären Calciumkonzentration hatten keinen signifikanten Einfluß auf die Noradrenalinwirkung. Die Verteilungskurven sind in den Abbildungen 20 und 21 dargestellt.

In der ersten Versuchsgruppe (0.95 mM Calcium/l) betrug das Membranpotential $-27,8 \pm 3.3 \text{ mV}$ ($n=74$, Mittelwert $\pm$ Standardabweichung), der niedrigste Wert $-10,5 \text{ mV}$, das höchste gemessene Potential $-39,8 \text{ mV}$. Mit einer Calciumkonzentration von 3.8 mM/l betrug das Membranpotential $-25,9 \pm 6.9 \text{ mV}$ ($n=69$, Mittelwert $\pm$ S.D.), das niedrigste Potential $-17,5 \text{ mV}$, der höchste Wert -46 mV . Die Mittelwerte und die Verteilungen unterschieden sich innerhalb der Versuchsgruppe und im Vergleich mit der Kontrollgruppe (ohne Noradrenalin) nicht signifikant.

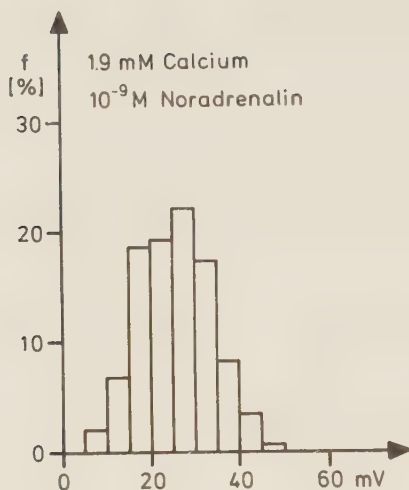


Abb.19.

Häufigkeitsverteilung der Membranpotentiale nach Applikation von 10^{-9} M Noradrenalin/l (Calciumkonzentration 1,9 mM, $-25,7 \text{ mV} \pm 8,4 \text{ mV}$, $n=143$).

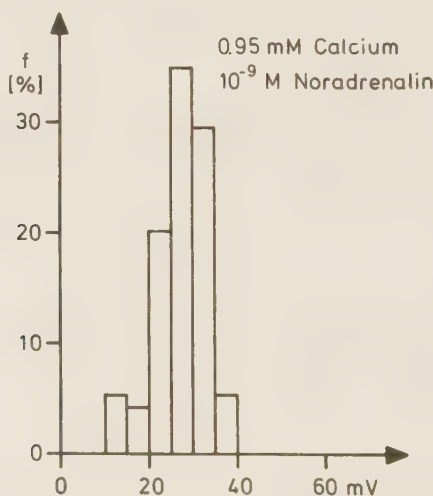


Abb.20.

Wie Abb.19. Calciumkonzentration 0,95 mM/l, $-27,8 \text{ mV} \pm 3,3 \text{ mV}$, $n=74$.

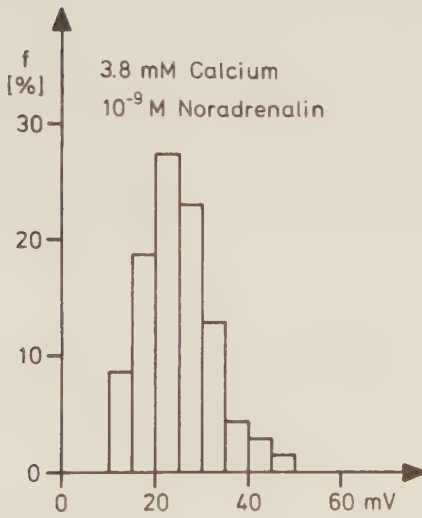


Abb.21.

Wie Abb.19, Calciumkonzentration 3,8 mM/l, $-25,9 \text{ mV} \pm 6,9 \text{ mV}$,
 $n=69$.

C.2.2. Einfluß einer Kurzzeit-Hypoxie auf das Membranpotential

Eine einminütige hypoxische Perfusion bewirkte in der Kontrollgruppe (ohne Noradrenalin, 1,9 mM Calcium/1) eine signifikante Hyperpolarisation ($t=60$ sec) der Hepatocyten um im Mittel 0.3 mV ($P<2.5\%$) bezogen auf das zum Zeitpunkt $t=0$ (Anoxiebeginn) gemessene Membranpotential (siehe Abbildung 22 und Tabelle 3). In nur einer von 12 Zellen wurde während Anoxie eine Abnahme des Membranpotentials (Depolarisation) gemessen. Abbildung 23 zeigt eine Originalregistrierung des Membranpotentials während einer solchen Reaktion. Eine erste Potentialänderung war bereits 10 sec. nach Beginn der hypoxischen Perfusion zu beobachten, die erste signifikante Änderung trat nach 40 sec auf. Der Endwert wurde nach 30-40 sec erreicht.

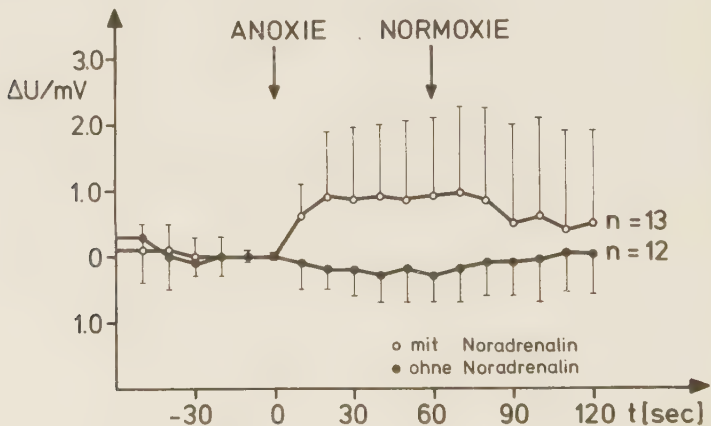


Abb.22:

Änderung des Membranpotentials während einer einminütigen Hypoxie ($\bar{x} \pm S.D.$, extracelluläre Calciumkonzentration 1,9 mM/1). Während ohne adrenerge Stimulation ($n=12$) eine Hyperpolarisation beobachtet wurde, trat nach Applikation von Noradrenalin ($n=12$) eine Hypoxie-induzierte Depolarisation auf.

Hypoxiebeginn $t=0$ s, Hypoxieende $t=60$ s. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen ist während der Hypoxie signifikant ($p<0,5\%$).

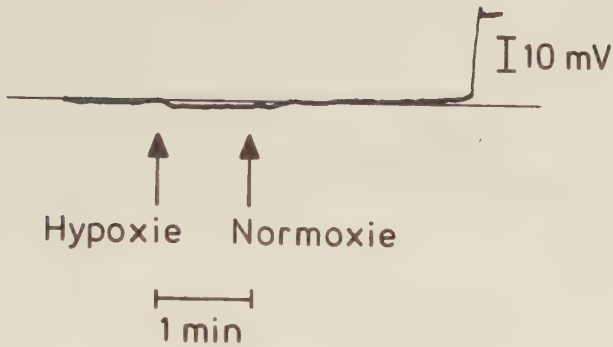


Abb.23:

Originalregistrierung des Membranpotentials. Während der Hypoxie kommt es zu einer Hyperpolarisation der Plasmamembran (1,9 mM Calcium, ohne Noradrenalin).

Diese während hypoxischer Perfusion beobachteten Potentialänderungen wurden vom Calciumgehalt des Perfusates beeinflusst. Bei Verwendung eines Perfusionsmediums mit einem Calciumgehalt von 0,95 mM/l wurde während hypoxischer Perfusion im Mittel eine Depolarisation beobachtet. Diese Änderungen waren nicht signifikant. Ein Maximalwert von 0,43 mV ($P < 10\%$) wurde nach 30 sec erreicht, nach 60 sec. betrug die Depolarisation im Mittel 0.2 mV (Abbildung 24, Tabelle 3).

Die Erhöhung der Calciumkonzentration auf 3.8 mM bewirkte eine Verstärkung der Hypoxie-induzierten Hyperpolarisation, diese betrug nach 60 sec. im Mittel 1.15 mV ($P < 5\%$, Abbildung 25, Tabelle 3).

In allen Gruppen waren diese Potentialänderungen reversibel.

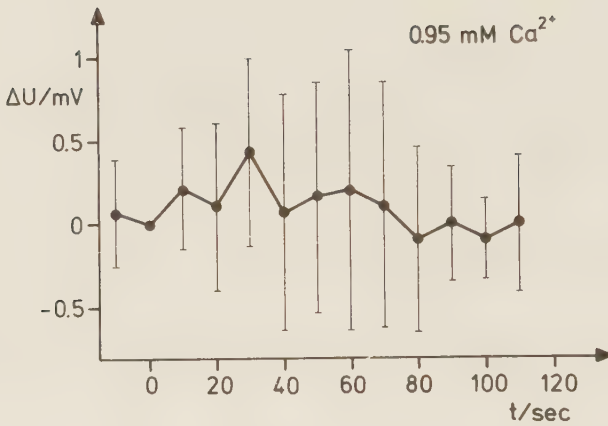


Abb.24:

Beträgt die extrazelluläre Calciumkonzentration 0,95 mM, treten während einer Hypoxie von 1 Minute Dauer keine signifikanten Änderungen des Membranpotentials auf (Hypoxiebeginn $t = 0$ s, Hypoxieende $t = 60$ s, $\bar{x} \pm \text{S.D.}$).

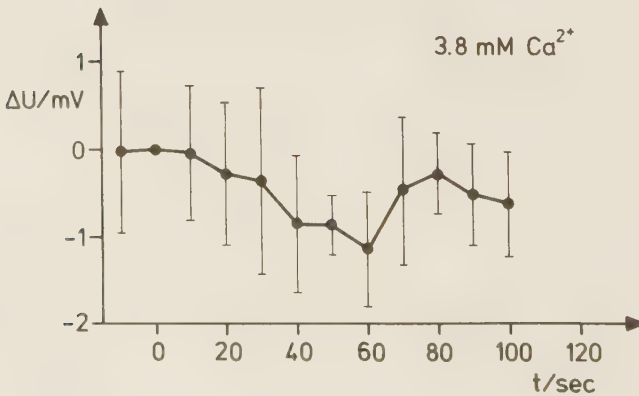


Abb.25:

Änderung des Membranpotentials während einer Hypoxie (Hypoxiebeginn $t = 0$ s, Hypoxieende $t = 60$ s). Der Calciumgehalt des Perfusates betrug 3,8 mM ($\bar{x} \pm \text{S.D.}$, $n = 16$). Nach 40 s trat eine signifikante ($p < 5\%$) Hyperpolarisation der Plasmamembran auf.

Nach Applikation von Noradrenalin (10^{-9} M/l, Calciumkonzentration 1.9 mM/l) wurde, im Gegensatz zu den Kontrollorganen, eine Depolarisation der Hepatocyten beobachtet. Abbildung 26 zeigt die Originalregistrierung des Membranpotentials während einer fünfminütigen hypoxischen Perfusion.

Eine erste signifikante Abnahme des Membranpotentials war bereits 10 sec. nach Beginn der hypoxischen Perfusion zu beobachten (0.6 mV, $P < 0.25\%$) der Maximalwert wurde bereits nach 20 sec. erreicht und betrug 0.9 mV ($P < 0.25\%$, Abb.22).

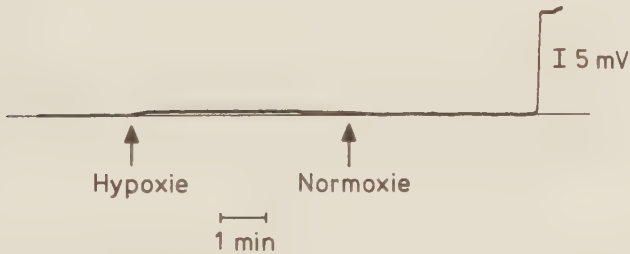


Abb.26:

Nach adrenerger Stimulation bewirkte Hypoxie eine Depolarisation der Zellmembran (1,9 mM Calcium, 10^{-9} M Noradrenalin). Originalregistrierung des Membranpotentials, Hypoxiedauer 5 min..

Mit einer Calciumkonzentration von nur 0.95 mM war diese hypoxiebedingte Depolarisation weniger stark ausgeprägt und erreichte einen Maximalwert von im Mittel 0.46 mV (n.s.) nach 60 sec (Abbildung 27, Tabelle 3).

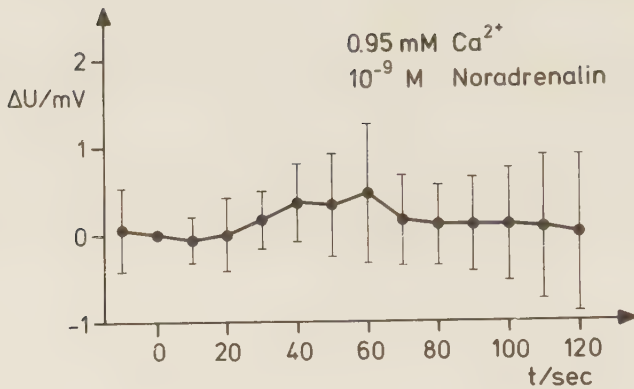


Abb.27:

Mit einer extracellulären Calciumkonzentration von 0,95 mM war auch nach Applikation von 10^{-9} M Noradrenalin/l keine signifikante Änderung des Membranpotentials zu beobachten ($\bar{x} \pm \text{S.D.}$), Hypoxiebeginn $t = 0$ s, Hypoxieende $t = 60$ s).

Die Erhöhung der Calciumkonzentration auf 3.8 mM hatte einen ähnlichen Potentialverlauf zur Folge. Wiederum wurde eine maximale mittlere Depolarisation von 0.44 mV ($P < 1\%$) bereits nach 40 sec erreicht, danach stieg das Membranpotential wieder an, erreichte aber den Ausgangswert während der Hypoxie nicht wieder (Abbildung 28).

Alle Veränderungen waren umkehrbar, das Ausgangsmembranpotential wurde jedoch innerhalb der Meßzeit nicht in jedem Fall wieder erreicht.

Abbildung 22 zeigt eine Darstellung der Membranpotentialänderungen in Abhängigkeit von der Zeit (extrazelluläre Calciumkonzentration 1.9 mM) aus der ersichtlich ist, daß mit noradrenalinhaltigem Perfusat eine signifikant verschiedene Änderung auftritt.

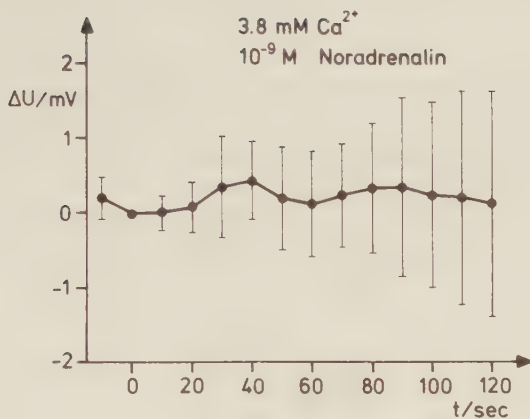


Abb.28:

Hypoxie-induzierte Änderung des Membranpotentials (Hypoxiebeginn $t = 0$ s, Ende $t = 60$ s). Nur nach 40 s Hypoxiedauer wurde eine signifikante Depolarisation der Plasmamembran beobachtet ($p < 1\%$, $\bar{x} \pm S.D.$).

Mit einem extracellulären Calciumgehalt von 0.95 mM waren die Hypoxie-induzierten Potentialänderungen in den beiden Gruppen nicht signifikant verschieden, während bei einem Calciumgehalt von 3.8 mM wiederum signifikante Unterschiede auftraten (Hypoxiedauer 40 sec = $P < 0.5\%$, 50 sec = $P < 6\%$, 60 sec = $P < 5\%$).

In Abbildung 29 ist die Beziehung zwischen der hypoxiebedingten Membranpotentialänderung und der extracellulären Calciumkonzentration dargestellt.

In der Kontrollgruppe (ohne Noradrenalin) bestand eine eindeutige Beziehung zwischen der hypoxiebedingten Potentialänderung und dem extracellulären Calciumgehalt. Während mit 0.95 mM Calcium eine Depolarisation beobachtet wurde, erfolgte mit ansteigender Calciumkonzentration eine zunehmende Hyperpolarisation.

Bei Anwesenheit von Noradrenalin im Perfusat bestand zwischen der extracellulären Calciumkonzentration und der hypoxiebedingten Membranpotentialänderung eine davon deutlich abweichende Beziehung. In diesen Experimenten wurde die stärkste Depolarisation

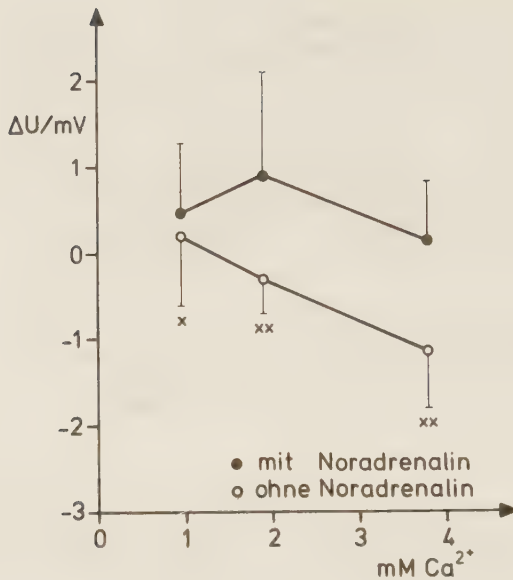


Abb. 29:

Hypoxie-induzierte Änderung des Membranpotentials in Abhängigkeit von der extracellulären Calciumkonzentration. Es wurden nur die Werte, die nach 60 s Hypoxiedauer bestimmt wurden, aufgetragen. Mit extracellulären Calciumkonzentrationen von 1,9 mM und 3,8 mM traten signifikante Unterschiede auf.

(++ = $p < 0,5\%$, + = n.s.).

mit 1.9 mM Calcium im Perfusat beobachtet, eine Erniedrigung wie auch eine Erhöhung der Calciumkonzentration hatten eine geringere Abnahme des Membranpotentials zur Folge. Der Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen ist eindeutig: In Anwesenheit von Noradrenalin bewirkt eine Hypoxie eine geringfügige Abnahme des Membranpotentials, d.h. es kommt zu einer relativen Positivierung des Zellinneren, während es in der Kontrollgruppe (ohne Noradrenalin) zu einer relativen Negativierung kommt.

C.3. Bestimmung des scheinbaren Membranwiderstandes R_M

Mit der oben beschriebenen Meßanordnung wurde der elektrische Widerstand (R_M) einzelner Leberzellen bestimmt. Abbildung 30 zeigt eine Originalregistrierung. In der linken Hälfte der Abbildung erfolgte die Messung im Intracellulärraum (R_{IZR}), danach wurde die Elektrode zurückgezogen und es erfolgte die Messung im Extracellulärraum (R_{EZR}). Die Differenz $R_{IZR} - R_{EZR}$ ergibt den scheinbaren Membranwiderstand R_M . Der Mittelwert

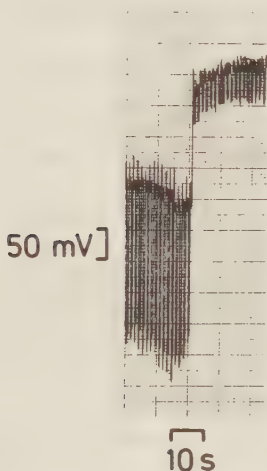


Abb.30:

Originalregistrierung der Spannung V_{out} im Intracellulärraum (linke Bildhälfte) und im Extracellulärraum (rechte Bildhälfte). V_{in} betrug 500 mV. Aus den gemessenen Werten wurden der Widerstand R_{IZR} und R_{EZR} berechnet.

betrug bei beinem Calciumgehalt des Perfusates von 1.9 mM/l $0.968 \times 10^7 \pm 0.6646 \times 10^7 \text{ Ohm}$ ($n=40$). Eine einminütige hypoxische Perfusion bewirkte eine Abnahme des Widerstandes R_M (Abbildung 31, Tabelle 4). Eine erste Änderung wurde bereits nach 10 sec beobachtet. Nach 60 sec hypoxischer Perfusion betrug die Abnahme $0.1096 \times 10^7 \pm 0.1208 \times 10^7 \text{ Ohm}$ (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung), d.h. der Widerstand nahm im Mittel um 11.3% ab.

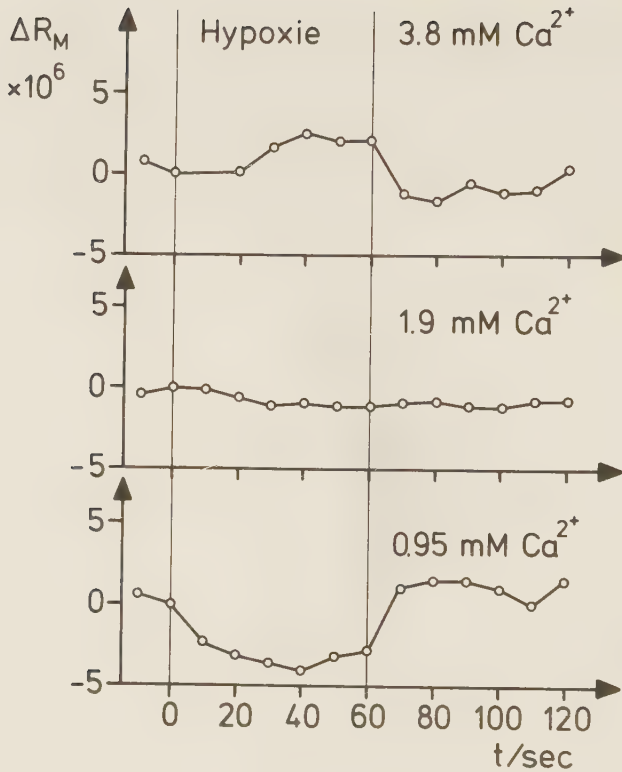


Abb.31.

Änderung des scheinbaren Membranwiderstandes R_M während hypoxische Perfusion. In der Abbildung sind nur die Mittelwerte aufgetragen (Standardabweichung und Signifikanz siehe Tabelle 4). Bei einem extracellulären Calciumgehalt von 0,95 mM kommt es zu einer deutlichen Abnahme von R_M , diese Abnahme ist bei einem extracellulären Calciumgehalt viel schwächer ausgeprägt. Betrug die extracelluläre Calciumkonzentration 3,8 mM, so kommt es zu einem Anstieg von R_M .

Das Ergebnis eines Einzelversuches ist in Abbildung 32 gezeigt. Die drei dargestellten Intervalle wurden vor Beginn der hypoxischen Perfusion (links), 45 sec - 60 sec nach Beginn der Hypoxie (mitte) sowie 10 sec - 30 sec nach Reoxygenierung (rechts) registriert.

Mit einer extracellulären Calciumkonzentration von 0.95 mM betrug R_M $1.5838 \times 10^7 \pm 1.7303 \times 10^7 \Omega$, die maximale Abnahme von im Mittel $0.1414 \times 10^7 \Omega$ wurde bereits nach 40 sec. erreicht (Abbildung 31, Tabelle 4), nach 60 sec hypoxischer Perfusion betrug die Abnahme nur noch $0.2919 \times 10^7 \Omega$. Die maximale Abnahme betrug 26.2%, nach 60 sec Hypoxie betrug die Abnahme nur noch 18.4%.

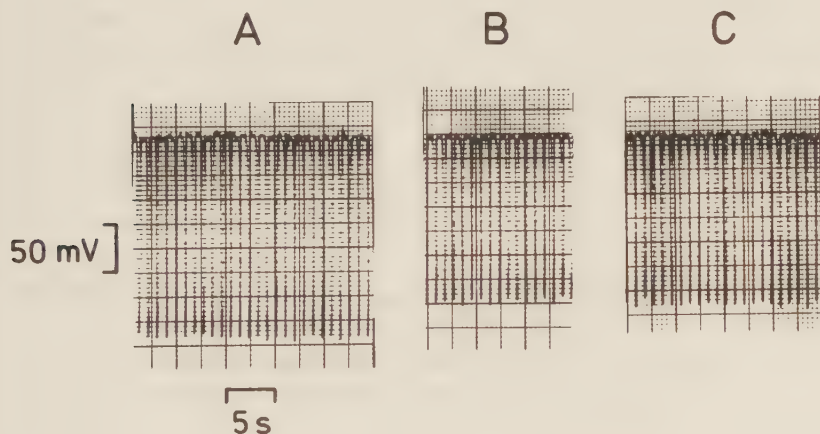


Abb.32:

Originalregistrierung der Spannung V_{out} vor (A), während (B) und nach (C) einer Hypoxie ($V_{in} = 500$ mV).

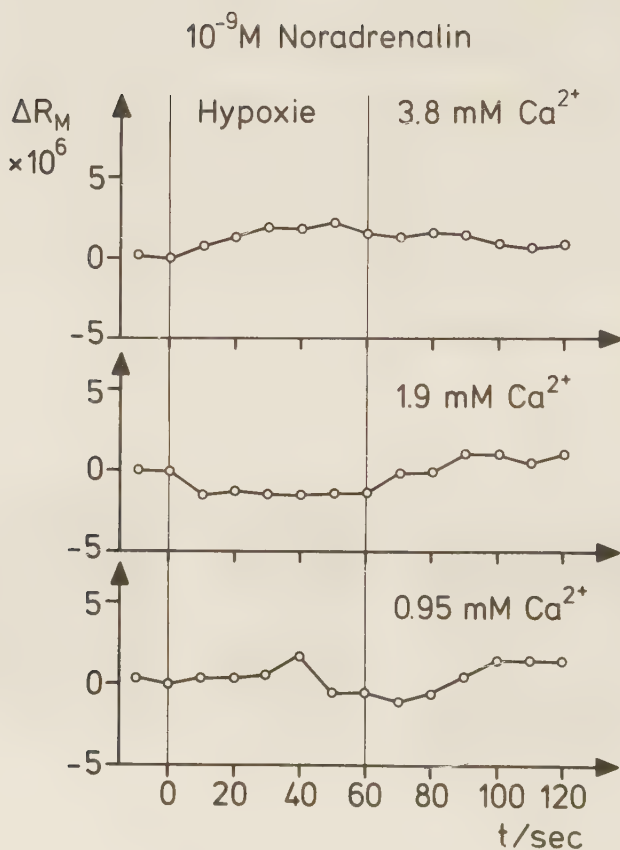


Abb.33.

Nach Applikation von 10^{-9} M Noradrenalin/l wurde die Hypoxie-induzierte Abnahme des Widerstandes R_M bei einem Calciumgehalt von 0,95 mM nicht mehr beobachtet. Betrug die extracelluläre Calciumkonzentration 1,9 mM kam es zu einer Abnahme, bei einem extracellulären Calciumgehalt von 3,8 mM zu einem Anstieg von R_M (Standardabweichung und Signifikanz siehe Tabelle 4).

Lebern, die mit einem Perfusat durchströmt wurden, das 3.8 mM Calcium/l enthielt, wiesen einen Widerstand R_M von $1.1411 \times 10^7 \pm 0.952 \times 10^7$ Ohm auf. In dieser Gruppe hatte eine hypoxische Perfusion keine Abnahme sondern eine Zunahme von R_M zur Folge. Der maximale Anstieg von R_M wurde nach 40 sec erreicht und betrug im Mittel 0.2472×10^7 Ohm, das sind 21.7% des Ausgangswertes. Nach 60 sec betrug die Abweichung nur noch 0.2085×10^7 Ohm, entsprechend 14,7% (Abbildung 31, Tabelle 4),

Die Applikation von Noradrenalin hatte keinen signifikanten Einfluß auf den Widerstand R_M (Tabelle 5). Bei einer Calciumkonzentration des Perfusates von 1.9 mM/l wurde ein Wert von $1.1707 \times 10^7 \pm 0.8871 \times 10^7$ Ohm (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung) bestimmt. Während hypoxischer Perfusion wurde nach 40 sec eine maximale Abnahme von im Mittel 0.1444×10^7 Ohm gemessen. Dieser Abfall des Widerstandes R_M entspricht im Mittel 12.3%, nach 60 sec betrug die Abnahme noch 0.1319×10^7 Ohm entsprechend 11.3% (Abbildung 33, Tabelle 4).

Die Erniedrigung der Calciumkonzentration auf 0.95 mM/l hatte einen Widerstand R_M von $0.598 \times 10^7 \pm 0.3158 \times 10^7$ Ohm zur Folge. Während hypoxischer Perfusion wurde zunächst, bis zur vierzigsten Sekunde, ein Anstieg von R_M , danach ein Abfall beobachtet. Der maximale Anstieg betrug 0.1795×10^7 Ohm (40 sec, 30%), nach 60 sec betrug die Abnahme 0.0495×10^7 Ohm (8.3%, Abb.33, Tabelle 4).

Mit erhöhter Calciumkonzentration (3.8 mM/l) wurde R_M mit $0.7097 \times 10^7 \pm 0.34 \times 10^7$ Ohm bestimmt. In dieser Versuchsreihe bewirkte eine hypoxische Perfusion einen Anstieg von R_M um maximal 0.2331×10^7 Ohm. Dieser Wert wurde nach 50 sec erreicht und entspricht 32.8% des Ausgangswertes. Nach 60 sec betrug der Anstieg von R_M noch 21.6% (Abbildung 33, Tabelle 4).

In Abbildung 34 sind die nach 60 sec Hypoxie gemessenen Widerstandsänderungen ΔR_M beider Versuchsgruppen in Abhängigkeit von der extracellulären Calciumkonzentration dargestellt. Ähnlich wie bei den Potentialänderungen war in den Kontrollgruppen (ohne Noradrenalin) eine lineare Beziehung

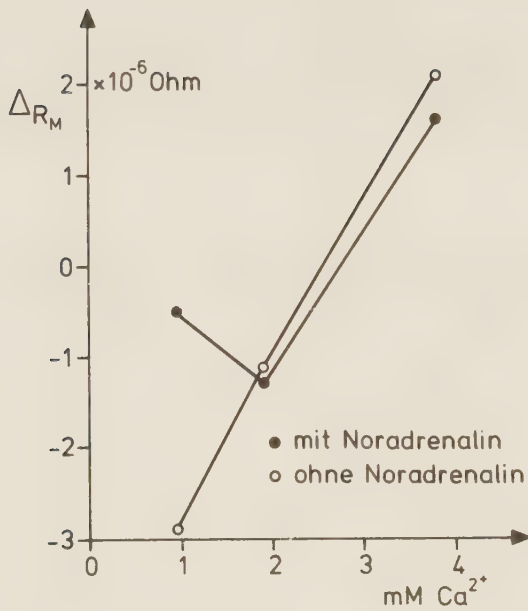


Abb.34.

Hypoxie-induzierte Änderung des Widerstandes R_M in Abhängigkeit von der extracellulären Calciumkonzentration. Es sind die Mittelwerte der nach 60 s Hypoxie berechneten Widerstandsänderungen aufgetragen. Die Unterschiede sind nicht signifikant verschieden (Tabelle 4).

zwischen der hypoxiebedingten Widerstandsänderung und dem extracellulären Calciumgehalt zu erkennen. Mit niedriger Calciumkonzentration wurde die stärkste Abnahme des Widerstandes, mit hoher Calciumkonzentration (3.8 mM/l) die stärkste Zunahme des Widerstandes R_M beobachtet.

Die Abhängigkeit der hypoxieinduzierten Widerstandsänderung vom extracellulären Calciumgehalt zeigte nach Applikation von Noradrenalin ein ähnliches Verhalten, allerdings waren die Änderungen mit niedriger Calciumkonzentration weniger stark ausgeprägt. Der Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen ist nicht signifikant.

C.4. Bestimmung der intercellulären elektrischen Koppelung

Die elektrotonische Ausbreitung einer lokal induzierten Spannungsänderung wurde mit der in Abbildung 9 gezeigten Anordnung bei unterschiedlichen extracellulären Calciumkonzentrationen untersucht. Abbildung 35 zeigt eine Originalregistrierung der simultanen Potentialmessungen in zwei Zellen. In Zelle 1 wurden pulsatile, hyperpolarisierende Potentialänderungen induziert, die sich elektrotonisch bis zur Zelle 2 ausbreiten. Es ist in dieser Abbildung zu erkennen, daß es während einer hypoxischen Perfusion zu einer Abnahme von V_1 (induzierte Potentialänderung in Zelle 1) und zu einem simultanen Anstieg von V_2 (Potentialänderung in der Zelle 2) kam.

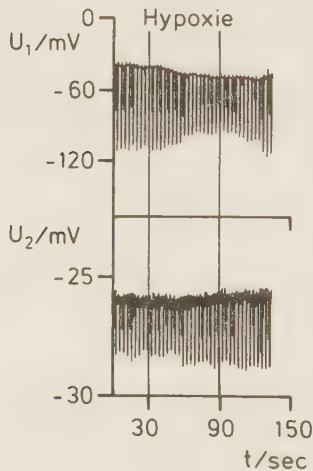


Abb.35:

Originalregistrierung von U_1 und U_2 während einer hypoxischen Perfusion. Es ist zu erkennen, daß es zu einer Abnahme von V_1 und einer leichten Zunahme von V_2 kommt. Der berechnete Quotient V_2/V_1 wird größer (U_1 und U_2 : Membranpotential + V_1 bzw. V_2).

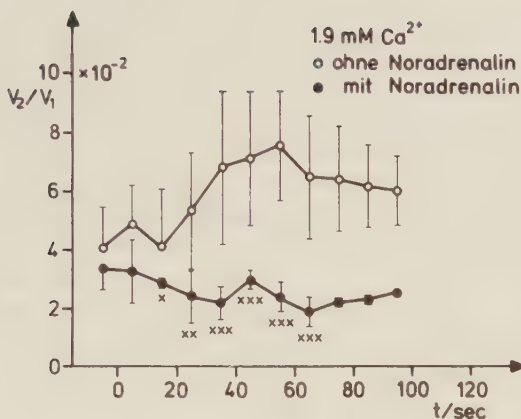


Abb.36.

Änderung des Quotienten V_2/V_1 während einer einminütigen Hypoxie ($\bar{x} \pm \text{S.D.}$, extracelluläre Calciumkonzentration 1,9 mM). Während unter Kontrollbedingungen (ohne Noradrenalin) eine Zunahme des Quotienten berechnet wurde ($n=5$), kam es nach Applikation von Noradrenalin ($n=5$) während der Hypoxie zu einer leichten Abnahme. Hypoxiebeginn $t=0$ s, Hypoxieende $t=60$ s, + = n.s., ++ $p < 2\%$, +++ $p < 1\%$.

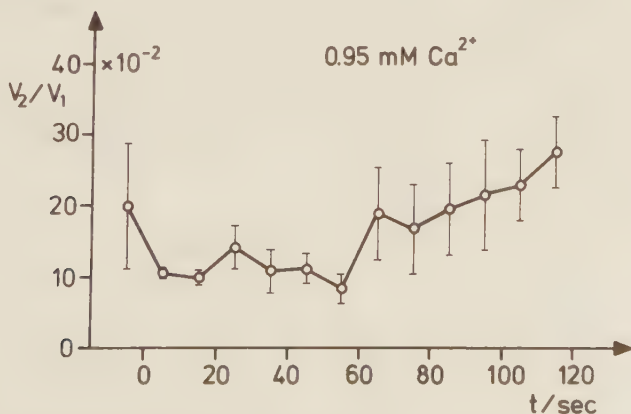


Abb.37.

Bei einer extracellulären Calciumkonzentration von 0,95 mM kommt es während einer einminütigen Hypoxie zu einer signifikanten Abnahme des Quotienten V_2/V_1 ($\bar{x} \pm \text{S.D.}$, $n=5$, Signifikanz s.Tabelle 6).

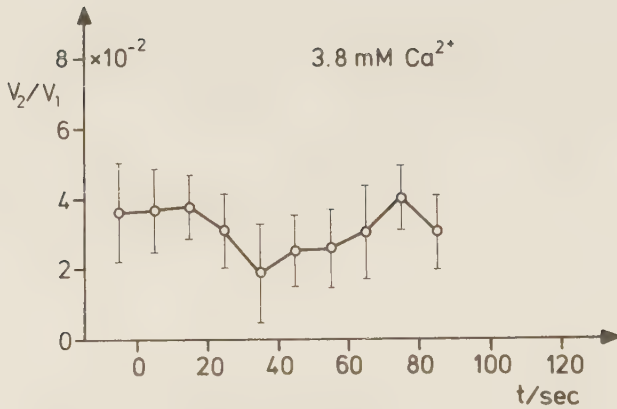


Abb.38.

Änderung des Quotienten V_2/V_1 während hypoxischer Perfusion, extracellulärer Calciumgehalt 3,8 mM. Hypoxiebeginn $t=0$ s, Ende $t=60$ s. Nach 35 s tritt eine signifikante Abnahme des Quotienten V_2/V_1 auf (siehe Tabelle 6, $\bar{x} \pm \text{S.D.}$, $n=5$).

Wie von Nakas et al. (1966) angegeben, wurde der Quotient aus V_2 (Potentialänderung in der Zelle 2) und V_1 (Potentialänderung in der Zelle 1) gebildet und als Maß für die elektrische Kopplung der untersuchten Zellen angesehen. Mit einer extracellulären Calciumkonzentration von 1.9 mM/l nahm der Quotient V_2/V_1 während der Hypoxie zu (Abbildung 36, Tabelle 6).

Eine Verminderung der extracellulären Calciumkonzentration auf 0.95 mM/l hatte zur Folge, daß der Quotient V_2/V_1 während der hypoxischen Perfusion abnahm (Abbildung 37, Tabelle 6). Diese Änderung war bedingt durch eine simultane Abnahme von V_1 und V_2 , wobei V_2 stärker abnahm als V_1 .

Bei einer extracellulären Calciumkonzentration von 3.8 mM/l bewirkte eine hypoxische Perfusion ebenfalls eine Abnahme des Quotienten V_2/V_1 (Abbildung 38, Tabelle 6). Unter diesen Bedingungen kam es, im Gegensatz zu den Reaktionen mit niedriger Calciumkonzentration, zu einem Anstieg von V_1 und einem gleichzeitigen Abfall von V_2 . Die Werte eines Einzelversuches sind in Abbildung 39 dargestellt.

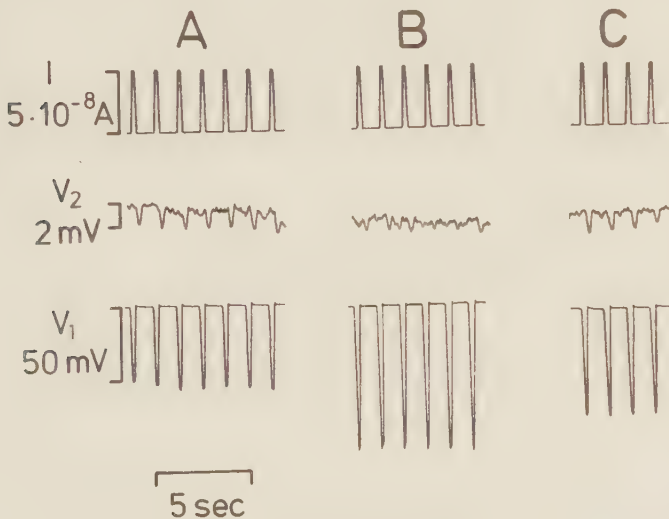


Abb. 39:

Originalregistrierung von I ($5 \times 10^{-8} \text{ A}$), V_1 und V_2 vor (A) während (B) und nach (C) einer Hypoxie. Während der Hypoxie nimmt V_1 zu während V_2 kleiner wird. Der Quotient V_2/V_1 wird unter diesen Bedingungen klein.

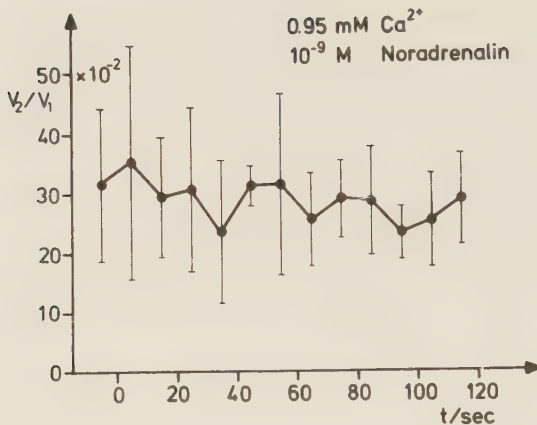


Abb.40.

Nach Applikation von 10^{-9} M Noradrenalin/l kam es während hypoxischer Perfusion (0,95 mM Calcium) zu keiner signifikanten Änderung des Quotienten V_2/V_1 ($\bar{x} \pm \text{S.D.}$, $n=5$) Hypoxiebeginn $t=0$ s, Ende $t=60$ s.

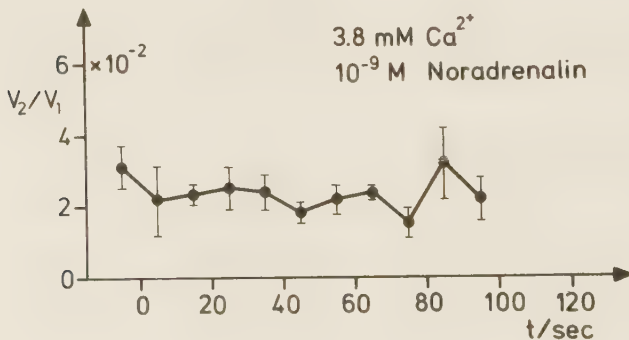


Abb.41.

Bei einer extracellulären Calciumkonzentration von 3,8 mM nimmt der Quotient V_2/V_1 während einer hypoxischen Perfusion ab (10^{-9} M Noradrenalin/l, $\bar{x} \pm \text{S.D.}$, $n=5$, Signifikanzen siehe Tabelle 6) Hypoxiebeginn $t=0$ s, Ende $t=60$ s.

Nach adrenerger Stimulation bewirkte ein Sauerstoffmangel bei einer extracellulären Calciumkonzentration von 1,9 mM/l eine Abnahme des Quotienten V_2/V_1 (Abbildung 36, Tabelle 6). Diese Verminderung war durch eine starke Abnahme von V_2 bei einer mäßigen Abnahme oder Konstanz von V_1 bedingt.

Nach Erniedrigung des extracellulären Calciumgehaltes auf 0,95 mM/l hatte eine hypoxische Perfusion keinen signifikanten Einfluß auf das Verhältnis der Spannungsänderungen V_2/V_1 (Abbildung 40, Tabelle 6).

Hingegen wurde nach einer Erhöhung der extracellulären Calciumkonzentration auf 3,8 mM/l während der Hypoxie wiederum eine Abnahme des Quotienten V_2/V_1 beobachtet (Abbildung 41, Tabelle 6). Auch in diesem Falle wurde die Änderung, wie unter Kontrollbedingungen, durch eine Zunahme von V_1 bei simultaner starker Reduzierung von V_2 hervorgerufen. Die Ergebnisse eines Einzelversuches sind in Abbildung 42 dargestellt.

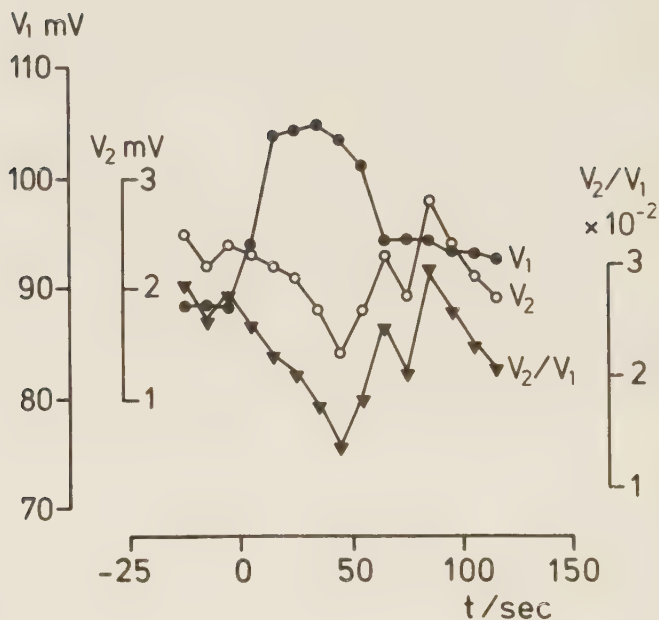


Abb.42.

Änderung von V_1 , V_2 und des Quotienten V_2/V_1 während einer einminütigen hypoxischen Perfusion in einem Einzelversuch. Die Abnahme des Quotienten V_2/V_1 ist das Resultat einer Zunahme von V_1 und einer simultanen Abnahme von V_2 .

D. DISKUSSION

D.1. Verteilung der Membranpotentiale

Die vorliegenden Resultate ergeben, daß die Membranpotentiale der Hepatocyten bei einer Versuchstemperatur von 22°C $-26 \pm 5,5$ mV betragen. Die niedrigsten gemessenen Potentiale betrugen bei den gegebenen Versuchsbedingungen (Calciumkonzentration des Perfusates 1,9 mM/l, ohne Noradrenalin) $-11,5$ mV, die höchsten Werte $-40,6$ mV. Diese Werte liegen alle unterhalb der unter in situ Bedingungen gemessenen Potentiale (Biedermann 1968, Schanne und Coraboeuf 1966, Shiba et al. 1978, Williams et al. 1971a). Der Grund hierfür könnte der Einfluß der niedrigsten Temperatur auf die Membranpermeabilität sein (Kolb und Adam, 1976). Daneben spielt, wie Egashira (1980) zeigen konnte, auch das Substratangebot im Perfusionsmedium bzw. in der Badlösung eine Rolle. In dem in der vorliegenden Untersuchung verwendeten Perfusionsmedium wurde kein Substrat angeboten, d.h. die Organe konnten nur ihr endogenes Substrat metabolisieren.

Lambotte (1973) konnte bei 20°C in einem, mit homologem Blut, perfundierten Organ Potentiale von -45.7 ± 1.5 mV messen. In diesem Falle könnte ebenfalls der Zusammensetzung des "Perfusates" eine bedeutende Rolle zukommen. Neben einem nahezu physiologischen Substratangebot werden dem Organ auch Hormone zugeführt, d.h. es liegt hier nur eine partielle hormonelle "Amputation" vor. Es ist bekannt, daß verschiedene Hormone einen Einfluß auf das Membranpotential haben (siehe Claret 1979).

Diese Faktoren können wohl die im Vergleich mit in situ-Werten beobachtete mittlere Verschiebung der Membranpotentiale erklären, geben aber keinen Hinweis auf das Zustandekommen der Unterschiede zwischen einzelnen Zellen.

Voraussetzung für die Untersuchung der Membranpotentiale von Hepatocyten in einem isolierten Organ ist eine adäquate Perfusion der Lebern. Wie frühere Untersuchungen von Höper et al. (1976) gezeigt haben, kommt es bei Auftreten von Störungen der Perfusion in der extremen Form einer no-flow-Anoxie (Ischämie) zu einem Natriumeinstrom in die und zu einem

Kaliumausstrom aus den Leberzellen. Diese ionalen Veränderungen haben eine Depolarisation der Plasmamembran zur Folge (Höper et al. 1976, Kessler und Höper 1981). Biedermann konnte bereits 1968 zeigen, daß eine Unterbrechung der Blutzufuhr zur Leber eine Depolarisation der Hepatocytenmembran zur Folge hat. In einem nicht ausreichend homogen perfundierten Organ können neben disseminierten no-flow-Anoxien auch low-flow-Anoxien auftreten. In solchen Gewebearealen wird man keine normalen Membranpotentiale vorfinden. Eine Abnahme der lokalen Durchströmung und damit das Auftreten von low-flow-Anoxien hat einen Anstieg des Gewebe- $p\text{CO}_2$ zur Folge (Ji et al. 1978). Eine solche Veränderung führt zu einer Depolarisation der Hepatocytenmembran (Williams et al. 1971). Untersuchungen von Höper und Kessler (in Vorbereitung) haben gezeigt, daß die angewendete Perfusionstechnik eine ausreichende Sauerstoffversorgung aller Gewebeareale ermöglicht, d.h. es liege keine Störungen der Mikrozirkulation und der lokalen Sauerstoffversorgung vor. Die vorliegenden Untersuchungen der lokalen Sauerstoffversorgung in den beiden untersuchten Leberlappen bestätigen diese Ergebnisse. Damit kann ausgeschlossen werden, daß die Verteilung der Membranpotentiale durch einen lokalen Energiemangel oder einen lokal erhöhten $p\text{CO}_2$ hervorgerufen wird. Darüberhinaus ließ sich kein Zusammenhang der gemessenen Potentiale zum untersuchten Leberlappen oder zur Einstichtiefe feststellen. Rappaport (1973) hat gezeigt, daß innerhalb eines "Leberläppchens" (Acinus) funktionell verschiedene Zellen auftreten. Ein solcher Acinus kann in 3 Zonen unterteilt werden. Die Zellen in Zone 1 sind nahe am versorgenden Gefäß, die Zellen der Zone 3 befinden sich in der Peripherie eines Acinus. Hieraus ergibt sich ein $p\text{O}_2$ -Gradient von Zone 1 nach Zone 3. Die Enzymausstattung der Zellen in diesen Zonen ist offenbar diesen Versorgungsbedingungen angepaßt, in der Zone 1 findet man die Enzyme des Glykogenstoffwechsels, in der Zone 3 dominieren die Enzyme des Lipid-, Steroid- und Pigmentstoffwechsels. Solche funktionell untersuchten Zellen könnten ebenfalls unterschiedliche Membranpotentiale aufweisen. Es war nicht möglich eine Zuordnung zwischen der untersuchten Zelle und dem Ort innerhalb eines Acinus zu treffen.

Die lokalen Sauerstoffdrucke weisen, wie Höper und Kessler (in Vorbereitung) gezeigt haben, in der hämoglobinfrei perfundierten Leber eine Verteilung zwischen 10 und 400 mmHg auf. Diese Werte stimmen mit den vorliegenden Ergebnissen gut überein (Abbildungen 13 und 14). Wie noch zu zeigen ist, kann das Membranpotential offenbar vom lokalen pO_2 beeinflusst werden.

Ein weiterer Faktor, der das Membranpotential beeinflussen kann, ist ein inhomogener Extrazellulärraum. Untersuchungen von Höper und Kessler (nicht publiziert) haben ergeben, daß die extrazelluläre Kaliumaktivität innerhalb eines Organs erhebliche Unterschiede aufweist. Eine solche Verteilung der Kaliumaktivität muß das Membranpotential der Hepatocyten direkt beeinflussen, da dieses ein Kaliumgleichgewichtspotential ist (Williams 1970).

Die von Höper und Kessler auf der Organoberfläche gemessenen Kaliumaktivitäten lagen in einem Organ zwischen 2,4 und 7 mM. Diese unterschiedlichen Kaliumwerte können, je nach Permeabilität, Potentialdifferenzen von 3 - 6 mV zur Folge haben. Ein

α (PN_a/P_K) von 0.11 (Höper et al. 1976) hätte bei extracellulären Kaliumaktivitäten von 2,4 mM und 7 mM eine Potentialdifferenz von 6 mV, ein α von 0.25 (Wands, 1969) einen solchen von 3 mV zur Folge. Wenn in einem Organ Zellen mit unterschiedlichen Permeabilitäten vorkommen, können Unterschiede im Membranpotential von maximal 24 mV auftreten (α 0.11, extracelluläre Kaliumaktivität 2,4 mM, α 0.25, extracelluläre Kaliumaktivität 7 mM).

Inwieweit diese unterschiedlichen Membranpotentiale die Funktion der Hepatocyten beeinflussen bzw. Ausdruck unterschiedlicher Funktionen sind, kann aufgrund der vorliegenden Untersuchungen nicht entschieden werden.

Die Potentialunterschiede können möglicherweise auch durch Messungen in verschiedenen Zelltypen hervorgerufen werden. Neben Hepatocyten findet man in der Leber Kuppfersche Sternzellen (Makrophagen) und Endothelzellen.

Calcium hatte in den angewendeten Konzentrationen keinen Einfluß auf das mittlere Membranpotential (Abbildungen 15-17). Die Mittelwerte, die mit hypo- und hypercalcämischen Perfusionslösungen berechnet wurden, unterschieden sich nicht signifikant von dem mittleren Membranpotential, welches bei Verwendung eines

normocalcämischen Perfusates gefunden wurde. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Kolb und Adam (1976), die zeigen konnten, daß im untersuchten Konzentrationsbereich (0.95-3.8 mM Calcium/l) nahezu keine Veränderung der Kaliumpermeabilität eintritt.

Frühere Untersuchungen von Höper und Kessler (1976) haben darüberhinaus gezeigt, daß auch der intrazelluläre Natriumgehalt den in situ-Werten entspricht.

Offenbleiben muß die Frage, wieso in elektrisch gekoppelten Zellen unterschiedliche Membranpotentiale auftreten können. Dies wäre nur möglich, wenn durch aktive Prozesse ein solcher Gradient aufrechterhalten wird oder nur bestimmte Zellgruppen gekoppelt sind.

D.2. Wirkung des Noradrenalins auf das Membranpotential

Die vorliegende Untersuchung hat gezeigt, daß Noradrenalin in der perfundierten Leber verschiedene Wirkungen auf das Membranpotential der Hepatocyten haben kann. Es wurden sowohl Hyper- wie auch Depolarisation, in einem Fall eine biphasische Veränderung beobachtet (Abb.18). Das mittlere Membranpotential wurde durch die verwendete Noradrenalinkonzentration allerdings nicht beeinflusst, daraus kann man schließen, daß Hyper- und Depolarisation in gleichem Umfang aufgetreten sein müssen. Die Noradrenalinkonzentration betrug 10^{-9} M/l und lag damit ca. 1000 mal niedriger als die von anderen Autoren verwendete Konzentration (Orozco und Sabelli, 1970, Haylett und Jenkinson, 1972 a,b, Egashira 1980). Dennoch ist dieser Wert über der physiologischen Noradrenalinkonzentration, die nach Angaben von Yamaguchi und Garceau (1980) in der A. hepatica bzw. Pfortader nur ca. 1/26 dieser Menge beträgt. Diese, im Vergleich zu anderen Untersuchungen niedrige Dosierung wurde gewählt um keine Durchblutungsänderung zu induzieren, die einen lokalen Sauerstoffmangel zur Folge hat. Wie aus Abbildung 14 ersichtlich ist, kommt es nach der Applikation von Noradrenalin nicht zu einer Zunahme der niedrigen Sauerstoffdrucke im Gewebe. Bereits eine 2,5fache höhere

Dosierung bewirkt das Auftreten lokaler Anoxien (Kessler et al. 1978).

Im Gegensatz zu den hier erhobenen Befunden zeigten frühere Untersuchungen von Lambotte (1973) und von Orosco und Sabelli (1970), daß Katecholamine in der Leber in situ und in perfundierten Organen immer eine Depolarisation zur Folge haben. Die Autoren wiesen nach, daß diese Reaktion über α -Adrenozeptoren ausgelöst wird. Lambotte (1973) nimmt an, daß es nach α -adrenerger Stimulation zu einem Anstieg der Natriumpermeabilität (P_{Na}) und zu einem Natriumeinstrom in die Hepatocyten kommt. Frühere Untersuchungen von Höper und Kessler (1978a,b) scheinen diese Hypothese zu bestätigen. Die Autoren konnten zeigen, daß die Applikation höherer Dosen von Noradrenalin einen ausgeprägten Natriuminflux zur Folge hat.

Im Gegensatz dazu diskutieren Haylett und Jenkinson (1972a,b), daß Noradrenalin eine Zunahme der Kaliumpermeabilität und einen Kalium-Efflux bewirkt. Die Autoren haben gezeigt, daß in Leberschnitten α - und β -Agonisten eine Hyperpolarisation auslösen können.

Lambotte (1973) hat zweimögliche Gründe für das Zustandekommen dieser Unterschiede diskutiert:

1. mögliche Speziesunterschiede (Haylett und Jenkinson führten ihre Untersuchungen an der Meerschweinchenleber durch, alle anderen Untersuchungen wurden an anderen Spezies durchgeführt)
2. in Abhängigkeit von der Präparation könnte die Natriumpermeabilität bereits vor der Zugabe von Noradrenalin unterschiedlich sein.

Diese zweite Möglichkeit könnte zu einer Veränderung des Ionen-gleichgewichtes zwischen Intra- und Extrazellulärraum führen. Betrachtet man einmal die Kalium- und Natriumgehalte der verschiedenen Präparate, so zeigen sich hier erhebliche Unterschiede. Die mittleren Natrium- und Kaliumgehalte, berechnet aus verschiedenen Publikationen, betragen in vivo $101,7 \pm 3$ mM/kg Trockengewicht bzw. $326,3 \pm 23,3$ mM/kg Trockengewicht (McLean 1963, Nestruck und Furneaux 1971, Williams und Woodburry 1971, Williams et al. 1971a). In perfundierten Organen ist bereits eine deutliche Abweichung von diesen Werten zu beobachten, der Natriumgehalt beträgt $41,1$ (Mazet et al. 1974) bzw. $160,1$ mM/kg

Trockengewicht (Claret et al. 1973), der Kaliumgehalt 287,1 (Mazet et al. 1974) bzw. 264,3 mM/kg Trockengewicht (Claret et al. 1973). In Gewebeschnitten beträgt der Natriumgehalt $285,3 \pm 33,5$ mM/kg Trockengewicht (Haylett und Jenkinson 1972a,b, Nestruck und Fureaux 1971), der Kaliumgehalt nur noch $258,7 \pm 11,1$ mM/kg Trockengewicht (Haylett und Jenkinson 1972a,b, Nestruck und Furneaux 1971). Die extrazellulären Natrium- und Kaliumkonzentrationen betragen bei diesen Präparationen $138,2 \pm 5,8$ mM/l bzw. $5,6 \pm 0,3$ mM/l, d.h. die beobachteten Unterschiede sind nicht durch die Zusammensetzung des extrazellulären Raumes bedingt. Daraus folgt, daß der intrazelluläre Natriumgehalt in den Schnitten am höchsten ist, d.h. der Natriumgradient zwischen Intra- und Extrazellulärraum ist am geringsten.

Die hohen Natriumgehalte in den Leberschnitten entsprechen den von Sayeed und Baue (1973) gefundenen Werten in der Leber während eines hämorrhagischen Schocks, also unter Bedingungen einer pathologisch gestörten Durchströmung und damit einer gestörten Ver- und Entsorgung des Gewebes (Sinagowitz et al. 1973). Höper et al. (1976) konnten darüberhinaus zeigen, daß sich unter solchen extrem pathologischen Bedingungen das Verhältnis der Natrium- zur Kaliumpermeabilität verändert.

Solche z.T. extrem starken Unterschiede in der Verteilung der Kationen müssen einen Einfluß auf die Wirkung des Noradrenalins haben. Egashira (1980) konnte zeigen, daß eine Verringerung des extrazellulären Natriumgehaltes und damit eine Abnahme des Natriumgradienten zu einer Abnahme der durch Noradrenalin ausgelösten Depolarisation führt.

Die in der vorliegenden Untersuchung gefundenen Unterschiede in der Noradrenalinwirkung könnten durch lokale Heterogenitäten der Permeabilität und der Ionenverteilung zwischen Intra- und Extrazellulärraum bedingt sein.

Wie in Abbildung 18 gezeigt ist, kann die gleiche Dosis Noradrenalin primär eine Hyper- oder auch eine Depolarisation zur Folge haben. In einem Fall kommt es primär zu einer Depolarisation und in einer zweiten Phase zu einer Repolarisation. Dieses zweiphasige Verhalten entspricht den Ergebnissen von Egashira (1980), der zeigen konnte, daß es zunächst zu einer

ausgeprägten Depolarisation, danach in Abhängigkeit von der Noradrenalinwirkung zu einem Wiederanstieg des Membranpotentials oder sogar zu einer Hyperpolarisation kommt. Die Depolarisation kann durch eine Zunahme der Natriumpermeabilität und einen Natriumeinstrom, die Hyperpolarisation durch eine Änderung der Kaliumpermeabilität bedingt sein. Wird die erste Komponente unterdrückt, bleibt nur die Hyperpolarisation erhalten. Dies könnte in den Versuchen von Haylett und Jenkinson (1972a,b) der Fall gewesen sein.

Andererseits beschreibt Lambotte (1973), daß α -Agonisten eine Depolarisation, β -Agonisten eine Hyperpolarisation auslösen. Noradrenalin kann an α - und β -Adrenoceptoren binden und deshalb bei ungleichmäßiger Verteilung dieser Rezeptoren sowohl eine Depolarisation wie auch eine Hyperpolarisation auslösen. Eine solche ungleichmäßige Verteilung von adrenergen Rezeptoren in den Kapillaren des Mesenteriums wird von Richardson und Johnson (1970) diskutiert.

Es ist nicht bekannt ob die Wirkung einer α -adrenergen Stimulation auf das Membranpotential durch einen second messenger vermittelt wird (Exton 1980). Sherlin et al. (1972) haben gezeigt, daß es nach α -adrenerger Stimulation nicht zu einem Anstieg des c-AMP kommt. Möglicherweise kommt der Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern hier eine Bedeutung zu (Blackmore et al. 1982).

Im Bereich der verwendeten extrazellulären Calciumkonzentrationen (0,95 mM/l, 1,9 mM/l, 3,8 mM/l) ist keine signifikante Beeinflussung der Noradrenalinwirkung festzustellen (Abbildungen 19-21). Dies ist im Einklang mit den Ergebnissen von Blackmore et al. (1982), die nachweisen konnten, daß auch die α -adrenerge Stimulierung der Phosphorylase in Hepatocyten unabhängig vom extrazellulären Calcium ist.

Berthon et al. (1983) konnten zeigen, daß Noradrenalin offenbar eine Abspaltung von Calcium von der Plasmamembran bewirkt, was eine Steigerung der Aktivität der Na-K-ATPase zur Folge hat. Eine Stimulierung der Na-K-ATPase durch Noradrenalin in Nervenzellen ist auch von anderen Arbeitsgruppen gezeigt worden (Wu und Phillis 1979, Adam-Vizi et al. 1979, Gilbert et al. 1980).

D.3. Einfluß einer Hypoxie auf das Membranpotential

Hypoxische Perfusion bewirkt, wie die Abbildungen 22 und 23 zeigen eine rasche Hyperpolarisation der Hepatocytenmembran, die bereits nach ca. 10 sec beginnt und nach 60 sec im Mittel 0,25 mV beträgt (1,9 mM Calcium/l, ohne Noradrenalin). Untersuchungen von Kessler et al. (1981b) haben ergeben, daß unterhalb eines Zufluß- pO_2 von 200 mmHg erste lokale Anoxien auftreten. Werden 80 mmHg im Zufluß unterschritten, so sind mehr als 70% des Gewebes anoxisch. Ein solcher Zustand liegt am Ende einer hypoxischen Periode von 60 sec vor.

In früheren Untersuchungen konnte von verschiedenen Autoren (Biedermann 1968, Höper et al. 1976, Lambotte 1970, Shiba et al. 1978) nachgewiesen werden, daß Störungen der Sauerstoffversorgung zu einer starken Depolarisation der Hepatocytenmembran führen. Allerdings wurden diese Messungen während no-flow Anoxie (Ischämie) durchgeführt. Unter diesen Bedingungen kommt es zu einer Akkumulation von CO_2 und sauren Metaboliten (Höper et al. 1976, Kessler und Höper 1981a). Die dadurch hervorgerufene Azidose bewirkt eine Änderung der Membranpermeabilität, eine Veränderung des Ionen-gleichgewichtes (Kessler, Höper 1981a) und eine Depolarisation. Während hypoxischer Perfusion, d.h. bei intakter Mikrozirkulation, treten diese Veränderungen nicht auf. Frimmer und Kreh (1971) konnten an der isoliert perfundierten Rattenleber nachweisen, daß durch die anaerobe Glycolyse genügend Energie für die Aufrechterhaltung des Kalium-Natrium-Gleichgewichtes bereitgestellt wird. Höper et al. zeigten bereits 1973, daß eine anoxische Perfusion von 1 Stunde Dauer nur eine leichte, nicht signifikante Abnahme des ATP-Gehaltes der Leber zur Folge hat. Heller und van der Kloot (1974) haben nachgewiesen, daß es in den ersten 30 Minuten nach NaCN-Applikation nicht zu einer Änderung des Membranpotentials kommt. In diesen Experimenten wurde der Sauerstoffpartialdruck des Perfusates konstant gehalten.

Die zitierten Befunde zeigen, daß nicht ein Energiemangel auslösender Faktor der beobachteten Änderungen des Membranpotentials während hypoxischer Perfusion ist. Eine Hyperpolarisation wie sie in Abbildung 22 gezeigt ist, kann

aufzutreten, wenn die Kaliumpermeabilität der Plasmamembran zunimmt. Eine selektive Permeabilitätszunahme wird beobachtet, wenn es zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumaktivität kommt (Hoffman 1979, Lassen et al. 1973, Meech 1974, Romero und Whittam 1971, Schwarz und Passow 1983).

Frühere Untersuchungen mit ionenselektiven Elektroden haben gezeigt, daß es während einer anoxischen Perfusion ohne Noradrenalin im Perfusat nicht zu meßbaren Veränderungen der extracellulären Aktivitäten von Kalium, Natrium und Calcium kommt (Höper und Kessler, unveröffentlichte Ergebnisse). Möglicherweise wird unter diesen Bedingungen die Calciumbindung an die Hepatocytenmembran verändert und dadurch die Ionenleitfähigkeit der Membran beeinflußt. Eine solche Änderung der Calciumbindung kann einhergehen mit einer Zunahme der intracellulären Calciumaktivität und scheint, nach den vorliegenden Ergebnissen abhängig zu sein von der extrazellulären Calciumkonzentration. Wie Abb.29 zeigt, kommt es zu einer calciumabhängigen Änderung des Membranpotentials.

Eine ähnliche pO_2 -abhängige Hyperpolarisation wurde von Coyer et al. (1981) an einer nicht identifizierten Gruppe von Aplysia-Neuronen gefunden. Die Autoren diskutierten eine Erhöhung des intracellulären freien Calciums als Auslöser für eine Zunahme der Kaliumpermeabilität und eine Hyperpolarisation der Zellmembran.

Im Gegensatz zu einer hypoxieinduzierten Hyperpolarisation wie sie unter Kontrollbedingungen (1.9 mM Calcium, ohne Noradrenalin) auftritt, kommt es bei Anwesenheit von Noradrenalin zu einer Depolarisation (Abbildungen 22, 27 und 28). Dieser Unterschied tritt signifikant nur auf bei extracellulären Calciumkonzentrationen von 1.9 mM und 3.8 mM. Eine solche calciumabhängige Depolarisation kann nur auftreten, wenn sich nicht nur die Kalium- sondern auch die Natriumpermeabilität ändert.

Höper und Kessler (1981) haben gezeigt, daß es während hypoxischer Perfusion oder durch Inhibierung der Monoaminoxidase-B unter diesen Bedingungen zu einem Natriumefflux kommen kann. Offenbar kommt es zu einer Beeinflussung der Natriumpermeabilität und zu einem Calcium-Natrium-Austausch.

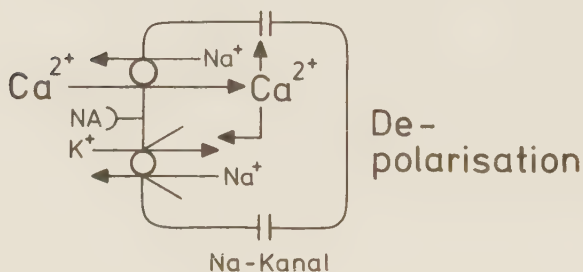


Abb.43:

Hypothetische Darstellung der Wirkung einer kurzen Hypoxie auf das Membranpotential der Hepatocyten.

Noradrenalin löst über α -Rezeptoren eine Erhöhung der Na^{+} -Permeabilität aus. Hypoxische Perfusion bewirkt eine Beeinflussung des Na -Kanals und einen Ca^{2+} - Na^{+} -Austausch. Unter diesen Bedingungen induziert die Hypoxie eine Depolarisation (weitere Einzelheiten siehe Text).

Wie Brown und Lew (1983) zeigen konnten, wird die Na-K-ATPase von Erythrocyten durch eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration in ihrer Aktivität vermindert. Möglicherweise stellt diese Reaktion eine Umkehr der noradrenalininduzierten Aktivierung der Na-K-Pumpe, wie sie von Berthon et al. (1983) beschrieben wurde, dar. Von verschiedenen Autoren (siehe Claret 1979) konnte gezeigt werden, daß die Kalium-Natrium-Pumpe in der Leber elektro- gen arbeitet, d.h. die Pumpe trägt durch einen auswärts gerichteten Nettotransport von Ladungen zum Membranpotential bei. Der Anteil am gesamten Membranpotential soll 2 - 7 mV betragen. Eine calciumabhängige Inhibierung der Na-K-ATPase kann möglicherweise an der beobachteten Depolarisation beteiligt sein.

Abbildung 43 zeigt eine zusammenfassende hypothetische Darstellung dieser Ergebnisse.

D.4. Bestimmung des scheinbaren Membranwiderstandes R_M

Die in den verschiedenen Kontrollgruppen bestimmten Widerstände R_M unterschieden sich nicht signifikant (Tabelle 5), d.h. das Calcium ist im untersuchten Konzentrationsbereich ohne Einfluß auf den Widerstand R_M . Dieses Resultat ist in Übereinstimmung mit den von Kolb und Adam (1976) erzielten Ergebnissen. Die Autoren konnten nachweisen, daß erst unterhalb einer extracellulären Calciumkonzentration von 10^{-4} Mol/l eine deutliche Änderung der Kaliumpermeabilität der Plasmamembran auftritt.

Ein Rückschluß auf die tatsächlichen Membranwiderstände ist aus den vorliegenden Messungen nicht möglich, da die Hepatocyten untereinander elektrisch gekoppelt sind. Aus diesem Grunde sind die von Schanne und Corabeuf (1966) publizierten Werte für den Membranwiderstand von 37 Ohm cm^2 zu niedrig, da mögliche Parallelwiderstände nicht berücksichtigt wurden. Eine alpha-adrenerge Stimulation mit 10^{-9} Mol Noradrenalin/l hatte keinen signifikanten Einfluß auf den Widerstand R_M . Möglicherweise treten hier, wie bei der Änderung des Membranpotentials, gegensinnige Effekte auf, so daß sich die Mittelwerte nicht signifikant von den Werten in der Kontrollgruppe unterscheiden.

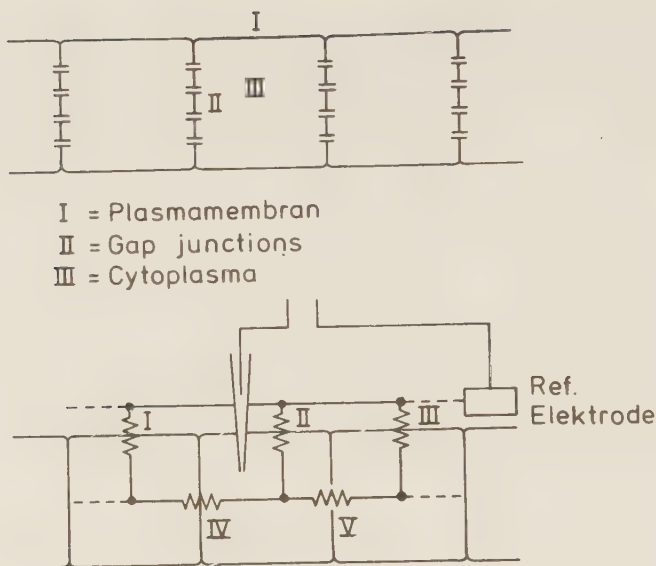
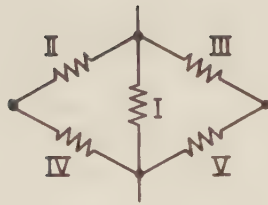


Abb.44:

Schematische Darstellung einer Zellreihe (oben). Die Zellen sind durch gap junctions (II) verbunden. Im unteren Teil der Abbildung sind die Widerstände, die in die Widerstandsmessung eingehen, eingezeichnet. Der Widerstand des Cytoplasmas wird nicht berücksichtigt.

Im unteren Teil der Abbildung sind I, II und III die Membranwiderstände R_{PMI} , R_{PMII} und R_{PMIII} der Zellen. IV und V sind die Widerstände der gap junctions R_{jI} und R_{jII} .



- | | | |
|-----|-----------------------|----------------|
| I | Plasmamembran Zelle 1 | = $R_{PM I}$ |
| II | Zelle 2 | = $R_{PM II}$ |
| III | Zelle 3 | = $R_{PM III}$ |
| IV | Gap junctions | = $R_{j I}$ |
| V | | = $R_{j II}$ |

Abb.45:

Ersatzschaltbild der in Abb.44 dargestellten Zellreihe. Da es sich um Parallelwiderstände handelt, kann aus der Messung des Gesamtwiderstandes bzw. der Änderung des Gesamtwiderstandes nicht auf die Einzelwiderstände geschlossen werden.

Wie in den Abbildungen 31, 32 und 33 gezeigt, läßt sich während einer hypoxischen Perfusion eine Widerstandsänderung erfassen. Da die Hepatocyten elektrisch gekoppelt sind (Penn, 1966) gibt diese Widerstandsänderung ΔR_M keine Auskunft über die tatsächliche Änderung eines Einzelzellwiderstandes. Abbildung 44 und Abbildung 45 sollen dies erläutern. In Abbildung 44 ist eine schematische Darstellung einer Reihe gekoppelter Zellen wiedergegeben. Eine solche Zellreihe mit 3 gekoppelten Zellen kann durch das in Abbildung 45 dargestellte Ersatzschaltbild beschrieben werden. Es wird hieraus ersichtlich, daß sowohl eine Änderung des Membranwiderstandes (R_{PM}) wie auch eine Änderung von R_L (Längswiderstand = Widerstand der gap-junctions + Widerstand des Cytoplasmas) einen Einfluß auf den Gesamtwiderstand (R_M) haben. Der Reziprokwert des Gesamtwiderstandes (R_M) einer solchen Zellreihe ist

$$\frac{1}{R_M} = \frac{1}{R_{PMI}} + \frac{1}{R_{PMII} + R_{jI}} + \frac{1}{R_{PMIII} + R_{jII}}$$

Da in der Leber eine dreidimensionale Verknüpfung der Hepatocyten besteht, ist es nicht möglich, aus den gemessenen Widerständen R_M und den Änderungen ΔR_M auf eine dieser Komponenten zu schließen.

Die hypoxiebedingten Widerstandsänderungen ΔR_M zeigen in beiden Versuchsgruppen eine Abhängigkeit von der extracellulären Calciumkonzentration. Die Unterschiede sind nicht signifikant und es besteht offenbar kein direkter Zusammenhang zwischen den während Hypoxie auftretenden Potentialänderungen und den Widerstandsänderungen.

D.5. Interzelluläre elektrische Koppelung

Wie aus Abbildung 44 hervorgeht und wie die Ergebnisse in den Abbildungen 35, 39 und 42 zeigen, sind die Hepatocyten elektrisch gekoppelt. Dieses Resultat steht im Einklang mit den Befunden von Penn (1966), der die elektrotonische Ausbreitung der in einer Zelle induzierten Potentialänderung untersucht hat. Nach Nakas et al. (1966) kann der Koppelungsgrad durch den Quotienten V_2/V_1 (Potentialänderung in Zelle 2 / induzierte Potentialänderung in Zelle 1) beschrieben werden. Dieser Koppelungsgrad beträgt mit 1,9 mM Calcium/1 Perfusat unter normoxischen Bedingungen $3,3 \cdot 10^{-2}$ und entspricht damit den von Penn (1966) für eine gleiche Entfernung (ca. 500 μm) angegebenen Werten. Das morphologische Substrat für die interzellulären Verbindungen sind die von verschiedenen Autoren in Lebern unterschiedlicher Spezies nachgewiesenen gap junctions (Robenek et al. 1980, Robenek et al. 1979, Yancey et al. 1981). Diese Strukturen ermöglichen eine elektrische wie auch eine metabolische Kommunikation zwischen den gekoppelten Zellen (Lawrence et al. 1978, Loewenstein 1966, 1978, Sheridan et al. 1979).

Die elektrotonische Ausbreitung einer lokal induzierten Spannungsänderung ist in erster Näherung abhängig vom Membranwiderstand R_{PM} und vom Längswiderstand R_L und kann durch die Längskonstante

$$\lambda = \sqrt{\frac{R_{PM}}{R_L}}$$

beschrieben werden. Der Längswiderstand R_L setzt sich, wie bereits beschrieben, aus dem Widerstand des Cytoplasmas und dem Widerstand der gap junctions zusammen. Bei konstantem Abstand der Elektroden führt eine Zunahme der Längskonstanten λ zu einem Anstieg des Quotienten V_2/V_1 , eine Abnahme von λ zu einer Abnahme des Quotienten. Entscheidend für die elektrotonische Ausbreitung einer Spannungsänderung, d.h. für den Quotienten V_2/V_1 ist das Verhältnis von R_{PM} zu R_L . Dies wird in Tabelle 7 dargestellt. Hier sind alle möglichen Kombinationen von Widerstandsänderungen, die zu einer Änderung der Längskonstanten führen können, aufgeführt. Es wird aus

V_2 / V_1	R_L	R_{PM}	R_M	λ
↓	↑	∅	↑	↓
↓	▲	↓	↑	↓
↓	↑	▼	↓	↓
↓	∅	↓	↓	↓
↑	↓	∅	↓	↑
↑	▼	↑	↓	↑
↑	↑	▲	↑	↑
↑	∅	↑	↑	↑

Tabelle 7

Qualitative Änderungen des Längs (R_L)- und des Membranwiderstandes (R_{PM}) und die daraus resultierenden Änderungen der Längskonstanten λ und des Quotienten V_2/V_1 .

Die Abnahme von V_2/V_1 ist das Resultat einer Abnahme der Längskonstanten λ , die Zunahme entsprechend Resultat einer Zunahme von λ .

Die Messung der Änderung des Gesamtwiderstandes R_M allein ergibt keinen Aufschluß über die Änderungen der Einzelwiderstände und der Längskonstanten.

∅ keine Änderung

↑↓ starke Zu- bzw. Abnahme des Widerstandes.

dieser Tabelle ebenfalls deutlich, daß aus der Änderung des Gesamtwiderstandes R_M nicht auf eine Komponente geschlossen werden kann.

In Tabelle 8 sind die qualitativen Veränderungen während Hypoxie schematisch zusammengefaßt. Hieraus wird ersichtlich, daß es, mit zwei Ausnahmen, während einer hypoxischen Perfusion zu einer Abnahme des Quotienten V_2/V_1 , d.h. zu einer Abnahme der Längskonstanten kommt.

Calcium	Noradrenalin	MP	R_M	V_2/V_1
0,95	-	Dep.	↓	↓
	+	Dep.	±	±
1,9	-	Hyp.	↓	↑
	+	Dep.	↓	↓
3.8	-	Hyp.	↑	↓
	+	Dep.	↑	↓

Tabelle 8 :

Qualitative Änderungen des Membranpotentials MP, des Widerstandes R_M und des Quotienten V_2/V_1 während hypoxischer Perfusion.

Mit einer extracellulären Calciumkonzentration von 3.8 mM steigt in beiden Versuchsgruppen, mit und ohne adrenerge Stimulation, der Widerstand R_M an (Abbildungen 31 und 33). Gleichzeitig nimmt V_2/V_1 ab (Abbildungen 38 und 41). Die Widerstandszunahme muß also durch eine Zunahme des Widerstandes R_L bedingt sein (siehe Tabelle 7). Daraus kann man schließen, daß die Durchlässigkeit der gap junctions für Ionen abgenommen hat. Die Änderungen des Membranpotentials lassen, wie bereits diskutiert wurde, den Schluß zu, daß es gleichzeitig zu einer Abnahme des Membranwiderstandes R_{PM} kommt. Nach adrenerger Stimulation bei 1.9 mM Calcium/l Perfusat kommt es zu einer hypoxiebedingten Abnahme von R_M

und gleichzeitig zu einer Abnahme des Quotienten V_2/V_1 , d.h. die Längskonstante wird kleiner. Um zu prüfen, ob unter diesen Bedingungen R_L ansteigt, wurde versucht, den Längswiderstand R_L bzw. die Änderung des Längswiderstandes R_L zu bestimmen. Das Ergebnis dieser Messungen ist in Abbildung 46 dargestellt.

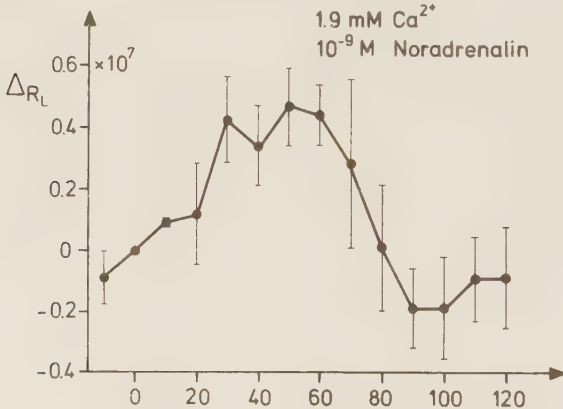


Abbildung 46:

Änderung des scheinbaren Widerstandes R_L während einer Hypoxie.

Es kommt zu einer Zunahme von R_L , d.h. die Abnahme des Gesamtwiderstandes R_M setzt sich zusammen aus einer Abnahme von R_{PM} und einer Zunahme von R_L . Auch in diesem Fall ändert sich die Permeabilität der gap junctions. Mit nur 0.95 mM Calcium/l Perfusat wurde während der Hypoxie eine Abnahme des Widerstandes R_M und eine Abnahme von V_2/V_1 beobachtet. Unter diesen Bedingungen nimmt V_1 stärker ab als V_2 . Dieses Resultat zeigt, daß es zu einer stärkeren Abnahme des Membranwiderstandes R_{PM} kommt, während sich R_L geringer ändert. Nach adrenerger Stimulation bewirkt eine Hypoxie weder eine signifikante Änderung des Quotienten V_2/V_1 noch eine signifikante Änderung des Widerstandes R_M .

Eine weitere Ausnahme stellen die während Hypoxie gemessenen Änderungen in der Kontrollgruppe mit einer extracellulären Calciumkonzentration von 1.9 mM dar. Während eines Sauerstoffmangels kam es zu einer Zunahme des Quotienten V_2/V_1 (Abbildung 36) und einer geringen Abnahme von R_M (Abbildung 31). Wie Abbildung 30 zeigt, nimmt V_1 unter diesen Bedingungen ab (Abnahme von R_{PM} und/oder R_L) während V_2 ansteigt (Abnahme von R_L). Die Permeabilität der gap junctions nimmt offensichtlich zu.

Alle bisherigen Untersuchungen über die Regulation der Durchlässigkeit von gap junctions haben gezeigt, daß das intrazelluläre Calcium eine besondere Bedeutung hat (Dahl und Isenberg 1980, DeMello 1980, Flagg-Newton und Loewenstein 1979, Loewenstein et al. 1978, Oliveira-Castro und Loewenstein 1971). Die "Kanal-Permeabilität" (Loewenstein, 1978) ist hoch, wenn die cytoplasmatische Calciumaktivität niedrig ist ($<10^{-7}$ M/l) und sie nimmt ab, wenn die Calciumaktivität steigt. Oberhalb einer Aktivität von ca. 5×10^{-5} M sind die gap junctions offenbar geschlossen (Oliveira-Castro, Loewenstein, 1971). Loewenstein und Mitarbeiter (Flagg-Newton und Loewenstein 1979) konnten nachweisen, daß die Permeabilität der gap junctions nicht einem Alles-oder-Nichts Gesetz folgt, sondern daß es zu einer graduierten Veränderung der Durchlässigkeit kommt. Zunächst nimmt die Permeabilität für größere Moleküle ab und erst im letzten Schritt erfolgt auch eine elektrische Abkoppelung, d.h. die Permeabilität der gap junctions für Ionen wird eingeschränkt. Eine verminderte Durchlässigkeit der gap junctions für größere Moleküle kann als metabolische Entkoppelung benachbarter Zellen betrachtet werden.

Eine hypoxieinduzierte Entkoppelung der Hepatocyten tritt bei einer extracellulären Calciumkonzentration von 3.8 mM ohne und mit adrenerger Stimulation auf, während mit 1.9 mM Calcium/l Perfusat diese Entkoppelung nur nach vorheriger Applikation von Noradrenalin beobachtet wird. Bei einer extracellulären Calciumkonzentration von 0.95 mM ist mit den verwendeten Methoden keine Entkoppelung mehr nachweisbar. Diese abgestufte Reaktion gibt einen weiteren Hinweis auf eine hypoxieinduzierte Zunahme der intracellulären Calciumaktivität. Offenbar kommt es, wie

bereits bei den hypoxiebedingten Änderungen des Membranpotentials diskutiert wurde, zu einer Zunahme der intrazellulären Calciumaktivität. Diese Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration bewirkt zwei Dinge: a) Abnahme des Membranwiderstandes und b) Zunahme des gap junction Widerstandes. Eine geringere Erhöhung des freien intrazellulären Calciums, wie sie mit einer niedrigeren extrazellulären Calciumkonzentration (0,95 mM) auftreten muß, bewirkt zunächst eine Abnahme des Membranwiderstandes und eine Abnahme des Quotienten V_2/V_1 durch eine Änderung der Längskonstanten. Erst eine starke Erhöhung der intrazellulären Calciumaktivität führt zu einer Zunahme des Widerstandes R_1 , also zu einer Abnahme der gap junction Permeabilität. Offenbar tritt bei einer extracellulären Calciumkonzentration von 1.9 mM eine solche ausreichende Erhöhung des freien intracellulären Calciums erst nach adrenerger Stimulation auf. Möglicherweise hat eine durch die Noradrenalinapplikation induzierte Freisetzung von Calcium aus intracellulären Speichern (Blackmore et al. 1982) eine wichtige Bedeutung. Die intracelluläre Calciumaktivität vor Induktion einer Hypoxie ist erhöht und ein zusätzlicher Calciuminflux bewirkt einen, für eine Entkoppelung ausreichenden Anstieg des freien intracellulären Calciums. Ohne adrenerge Stimulation tritt diese Entkoppelung nicht auf, der Widerstand R_1 nimmt sogar ab. Unter diesen Bedingungen muß es noch einen zusätzlichen Mechanismus geben, der eine Zunahme der gap junction Permeabilität bewirkt. Dies bedeutet, daß auch unter normoxischen Bedingungen nicht alle intercellulären Kanäle völlig geöffnet sind.

Die bisher diskutierten Befunde können wie folgt zusammengefaßt werden:

Sauerstoffmangel führt offensichtlich zu einer Erhöhung der intracellulären Calciumaktivität und zu einer Zunahme der Kaliumpermeabilität. Hierdurch wird, ohne adrenerge Stimulation, eine Hyperpolarisation ausgelöst. Nach Applikation von Noradrenalin bewirkt eine Hypoxie eine Depolarisation der Hepatocytenmembran. Möglicherweise ist hierfür eine erhöhte

Natriumpermeabilität der Plasmamembran, ausgelöst durch die alpha-adrenerge Stimulation verantwortlich. Es muß auch eine Inhibierung der durch Noradrenalin stimulierten Na-K-ATPase durch einen Anstieg der intracellulären Calciumaktivität in Betracht gezogen werden.

Ist die Erhöhung des intrazellulären Calciums stark genug ausgeprägt, so nimmt die Durchlässigkeit der gap junctions ab, der Längswiderstand steigt an. Es kommt zu einer partiellen Entkoppelung benachbarter Hepatocyten. Dies ist unter Kontrollbedingungen der Fall, wenn die extrazelluläre Calciumkonzentration 3,8 mM/l beträgt. Bei Anwesenheit von Noradrenalin ist bereits mit einer extrazellulären Calciumkonzentration von 1,9 mM/l eine solche Entkoppelung zu beobachten. Diese Abnahme des Koppelungsgrades deutet daraufhin, daß eine metabolische Entkoppelung vorliegen könnte. Die Abnahme des Quotienten V_2/V_1 mit 0,95 mM Calcium/l Perfusat ohne Noradrenalin muß auf eine Änderung der Längskonstanten durch eine Abnahme des Membranwiderstandes R_{PM} zurückgeführt werden. Diese Resultate sind in Abbildung 47 zusammengefaßt. Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann nicht entschieden werden, ob ein Calciumeinstrom in die Hepatocyten vom Auftreten lokaler Anoxien abhängt. Die sehr raschen Änderungen von Membranpotential, Widerstand und elektrotonischer Ausbreitung zeigen jedoch, daß diese Änderungen unabhängig von einem cellulären Energiemangel sind, da auch nach einer Stunde anoxischer Perfusion kein signifikanter Abfall des ATP-Gehaltes auftritt (Höper et al. 1973). Da es offenbar bereits bei niedrigen lokalen pO_2 -Werten zu einem Calciumeinstrom kommt, wird dieser Influx entlang eines Sinusoides unterschiedlich stark ausgeprägt sein. Am "arteriellen" Ende des Sinusoids ist der Sauerstoffpartialdruck am höchsten, hier wird der geringste Calciumeinstrom stattfinden, während am "venösen" Ende, wo bereits Anoxien auftreten der stärkste Calciuminflux auftreten muß (Abbildung 47). Diese lokalen Heterogenitäten könnten der Grund für die relativ starke Streuung sowohl der Membranpotential- wie auch die Widerstandsänderung sein. Wenn diese pO_2 -abhängige Regulation der Zellkommunikation in die Durchblutungsregulation involviert ist,

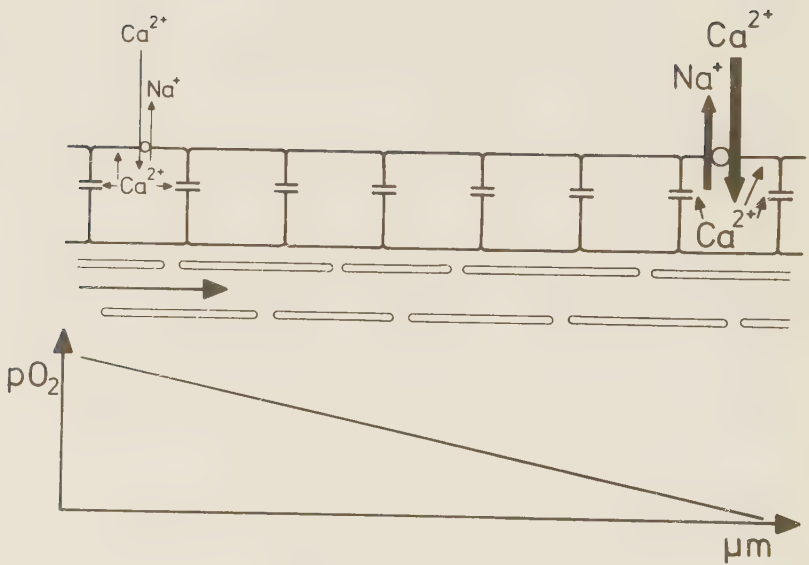


Abb.47.

Hypothetischer Abfall des pO_2 längs eines Sinusoides und hypothetische Änderung des Calciumeinstromes in die Hepatocyten. Der stärkste Calciuminflux findet vermutlich am venösen Ende statt. (Einzelheiten siehe Text).

muß es eine Informationsübertragung auf die von verschiedenen Autoren (Knisely et al. 1957, McCuskey 1966,) beschriebenen Sphincter oder muskuläre Gefäßstrukturen geben. Eine solche Signalkette wurde von Kessler et al. (1984) postuliert. Die Ergebnisse von Koo und Liang (1979 a,b) geben Hinweise darauf, daß möglicherweise die Endothelzellen eine Bedeutung bei der Regulation der Sinusoiddurchströmung haben.

Eine Signalübermittlung über die Endothelzellen hin zu den Arteriolen könnte auch in die Regulation des Gefäßtonus dieser kleinsten muskulären Gefäße involviert sein. Greenberg et al. (1983) diskutierten ein Modell in dem die Endothelzellen die Mediatoren für Relaxation und Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur freisetzen. Eine direkte Beeinflussung des Gefäßtonus durch eine elektrotonisch fortgeleitete Änderung des Membranpotentials der Hepatocyten kann wegen der geringen Amplitude dieser Änderungen ausgeschlossen werden.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob eine kurze Hypoxie einen Einfluß auf das Membranpotential und die elektrische Koppelung von Hepatocyten hat. Die Experimente wurden an der isolierten, hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber durchgeführt.

Zunächst wurde die Wirkung von Noradrenalin auf das Membranpotential untersucht. Dabei zeigte sich, daß es lokal zu unterschiedlichen Reaktionen kommt. Es wurde sowohl eine Depolarisation wie auch eine Hyperpolarisation beobachtet. In einem Fall kam es zu einer biphasischen Änderung des Membranpotentials. Diese Unterschiede kommen möglicherweise durch Differenzen in der extrazellulären Kaliumkonzentration und lokale Unterschiede in der Membranpermeabilität zustande.

Eine einminütige Hypoxie bewirkte in der Kontrollgruppe (ohne Noradrenalin) eine calciumabhängige Hyperpolarisation, nach Noradrenalinapplikation eine calciumabhängige Depolarisation der Hepatocytenmembran.

Im ersten Fall scheint es zu einer calciumabhängigen Erhöhung der Membranpermeabilität zu kommen. Nach Noradrenalinapplikation muß es zu einer simultanen Änderung der Kalium- und der Natriumpermeabilität kommen. Möglicherweise ist auch eine Hemmung der Na-K-ATPase durch Calcium mit für die Depolarisation verantwortlich.

Die Erhöhung der intracellulären Calciumaktivität hat nicht nur eine Änderung des Membranwiderstandes sondern auch eine Beeinflussung des Längswiderstandes zur Folge. Dieser Längswiderstand ist abhängig von der Permeabilität der gap junctions. Diese wiederum wird durch eine Erhöhung der intracellulären Calciumaktivität gesenkt. Es kommt, in Abhängigkeit von der extracellulären Calciumkonzentration, zu einer partiellen Entkoppelung der Hepatocyten. Diese Entkoppelung verändert möglicherweise die Informationsübertragung zu den Strukturen,

die den Gefäßdurchmesser regulieren. Dieser Mechanismus könnte in die pO_2 -abhängige Durchblutungsregulation involviert sein.

t/s	pO ₂ mm Hg	±
-10	580.5	17.1
-5	581.2	14.9
0	580.7	16.1
5	472.5	21.1
10	351.0	10.9
15	243.0	9.1
20	175.5	10.2
25	128.3	8.4
30	94.5	7.9
35	87.8	5.9
40	81.0	8.1
45	74.9	7.2
50	69.1	6.1
55	65.6	4.2
60	61.4	5.0
65	108.0	19.1
70	229.5	11.3
75	378.0	8.3
80	459.0	9.2
85	519.8	9.5
90	567.0	10.1
95	580.5	9.8
100	600.0	11.2
195	594.0	15.1
110	580.0	10.1
115	567.0	14.1
120	571.0	12.4

Tabelle 1:

Sauerstoffpartialdruck im Perfusionsmedium (Hypoxie 0-60 s).

Tabelle 2:

0.5	-10	-15	-20	-25	-30	-35	-40	-45	-50	-55	-60	mV	Ca ²⁺ mM	Noradrenalin
	1	12	18	26	28	15	3	3			1		0,95	-
	1	11,5	17,3	25	26,9	14,4	2,9	2,9			1			
	8	29	73	82	34	9	2	0,8					1,9	-
	3,4	12,2	30,8	34,6	14,3	3,8								
	12	22	21	38	38	8	8			3	2		3,8	-
	7,6	14,0	13,4	24,2	24,2	5,1	5,1		5	1,9	1,3			
	4	3	15	26	22	4							0,95	+
	5,4	4,1	20,3	35,1	29,7	5,4								
	3	10	27	32	25	12								
	2,1	6,9	18,7	22,2	17,4	8,3	5	3,5	1				1,9	+
					0,7									
	6	13	19	16	9	3	2	2	1					
	8,7	18,8	27,5	23,2	13,0	4,3	2,9	2,9	1,4				3,8	+

Verteilung der unter den verschiedenen Versuchsbedingungen gemessenen Membranpotentiale.

Tab. 3: Membranpotentialänderung während Hypoxie (Hypoxie 0-60s)

Calcium 0.95 mM					Calcium 1.9 mM			Calcium 3.8 mM		
t/s	ΔU mV	± mV	n	P	ΔU mV	± mV	n	ΔU mV	± mV	n
-10	-0.07	0.32	7	n.s.	0	0.1	12	0.02	0.93	10
0	0	0.21	7	n.s.	0.1	0.4	12	0.02	0.65	10
10	-0.21	0.36	7	n.s.	0.2	0.3	12	0.275	0.83	10
20	-0.11	0.5	7	n.s.	0.3	0.4	12	0.355	1.07	10
30	-0.43	0.56	7	n.s.	0.2	0.4	12	0.85	1.78	10
40	-0.06	0.72	5	n.s.	0.3	0.5	12	0.85	0.34	10
50	-0.16	0.69	5	n.s.	0.2	0.4	12	1.15	0.66	10
60	-0.2	0.83	5	n.s.	0.3	0.5	12	0.47	0.85	10
70	-0.1	0.74	5		0.2	0.5	11	0.28	0.46	8
80	0	0.56	5		0.1	0.5	11	0.53	0.58	8
90	0	0.34	5		0.05	0.65	10	0.63	0.61	8
100	0	0.24	5		-0.05	0.6	10	1.21	0.73	7
110	0	0.41	5		-0.02	0.6	10	1.18	0.55	7
120										
Calcium 0.95 mM					Calcium 1.9 mM			Calcium 3.8 mM		
t/s	ΔU mV	± mV	n	P	ΔU mV	± mV	n	ΔU mV	± mV	n
-10	-0.06	0.47	8	n.s.	0	0.1	12	-0.2	0.29	12
0	0	0.27	8	n.s.	0.6	0.5	12	0	0.25	12
10	0.06	0.43	8	n.s.	-0.9	1.0	12	-0.085	0.34	12
20	-0.13	0.53	8	n.s.	-0.85	1.1	12	-0.35	0.69	12
30	-0.39	0.75	8	n.s.	-0.9	1.1	12	-0.44	0.35	12
40	-0.32	0.59	8	n.s.	-0.85	1.2	11	-0.3	0.69	12
50	-0.32	0.82	7		-0.9	1.3	11	-0.3	0.7	12
60	-0.46	0.83	7		-0.96	1.4	6	-0.25	0.69	10
70	-0.15	0.45	5		-0.6	1.4	6	-0.34	0.87	10
80	-0.1	0.54	5		-0.6	1.3	6	-0.34	1.21	10
90	-0.1	0.65	4		-0.6	1.5	6	-0.24	1.34	10
100	-0.1	0.82	4		-0.6	1.4	6	-0.24	1.44	10
110	-0.07	0.9	3		-0.45	1.4	5	-0.22	1.51	9
120	0							-0.128		
10				+ < 10%	+ < 0.5%					
20				n.s.	< 0.5%					n.s.
30				n.s.	< 0.5%					n.s.
40				n.s.	< 0.5%					< 10%
50				n.s.	< 0.5%					< 0.5%
60				n.s.	< 0.5%					< 0.5%

+ Signifikanz zwischen den Versuchen mit und ohne Noradrenalin

Calcium 0.95 mM			Calcium 1.9 mM			Calcium 3.8 mM		
t/s	ΔR_M $\times 10^7$	$\pm$ $\times 10^7$	n	P	ΔR_M $\times 10^7$	$\pm$ $\times 10^7$	n	P
-10	0.0595	0.1491	5	n.s.	-0.037	0.1552	16	n.s.
10	-0.2345	0.4204	5	n.s.	-0.01272	0.2007	16	n.s.
20	-0.3172	0.526	5	n.s.	-0.0633	0.2804	16	n.s.
30	-0.3555	0.523	5	n.s.	-0.1071	0.3235	16	n.s.
40	-0.4144	0.519	5	n.s.	-0.0973	0.1392	16	n.s.
50	-0.3181	0.443	4	n.s.	-0.1074	0.1174	13	n.s.
60	-0.2919	0.511	4	n.s.	-0.0896	0.1208	12	n.s.
70	-0.1011	0.1011	4		-0.0889	0.0981	12	
80	0.1515	0.051	4		-0.085	0.0939	11	
90	0.1312	0.1011	4		-0.1121	0.093	10	
100	0.1011	0.1034	4		-0.1111	0.0718	9	
110	0.1034	0.1034	4		-0.0726	0.077	7	
120	0.1517	0.1517	3		-0.0836	0.0707	7	
Calcium 0.95 mM			Calcium 1.9 mM			Calcium 3.8 mM		
Noradrenalin $10^{-9}M$			Noradrenalin $10^{-9}M$			Noradrenalin $10^{-9}M$		
-10	0.0398	0.0488	5	n.s.	0.0625	0.0568	15	<2.5%
10	0.0402	0.1489	5	n.s.	-0.1412	0.2239	15	<10%
20	0.0402	0.1612	5	n.s.	0.1229	0.2806	15	<10%
30	0.0599	0.135	5	n.s.	-0.1417	0.2953	15	<10%
40	0.1795	0.214	5	n.s.	-0.1444	0.2873	15	<10%
50	-0.0495	0.111	4	n.s.	-0.1364	0.2895	15	<10%
60	-0.0495	0.149	4		-0.1319	0.234	15	<10%
70	-0.1	0.14	4		-0.0066	0.3904	14	<10%
80	-0.0493	0.149	4		-0.0048	0.3584	12	
90	0.0502	0.149	4		-0.1148	0.2519	12	
100	0.1495	0.0498	4		0.1149	0.2384	10	
110	0.1495	0.05	4		0.0536	0.2032	10	
120	0.1495	0.05	4		0.1144	0.2024	10	
10			+ n.s.					+ n.s.
20			n.s.					n.s.
30			n.s.					n.s.
40			n.s.					n.s.
50			n.s.					n.s.
60			n.s.					n.s.
			+ Signifikanz zwischen den Versuchen mit und ohne Noradrenalin					

Tabelle 5

Noradrenalin	-	+
0,95mM Ca ²⁺	1,5838 x 10 ⁷ Ohm ± 1,7303 x 10 ⁷ Ohm n = 16	0,598 x 10 ⁷ Ohm 0,3158 x 10 ⁷ Ohm n = 15
1,9mM Ca ²⁺	0,9684 x 10 ⁷ Ohm ± 0,6646 x 10 ⁷ Ohm n = 40	1.1707 x 10 ⁷ Ohm ±0,8871 x 10 ⁷ Ohm n = 34
3,8mM Ca ²⁺	1.1411 x 10 ⁷ Ohm ± 0,952 x 10 ⁷ Ohm n = 32	0,7097 x 10 ⁷ Ohm ±0,340 x 10 ⁷ Ohm n = 19

Gesamtwiderstand R_M unter verschiedenen Versuchsbedingungen.
($\bar{x} \pm S.D.$)

LITERATURVERZEICHNIS

- Adachi, H., Strauss, W., Ochi, H., Wagner, H.N.
The Effect of Hypoxia on the Regional Distribution of Cardiac
Output in the Dog.
Circ.Res., 39, 314-319, 1976
- Adam-Vizi, V., Vizi, E.S., Horvath, I.
Stimulation by Noradrenaline of Na-K-ATPase in Different
Fractions of Rat Brain Cortex.
J. Neural Transmission, 46, 59-69, 1979
- Berne, R.M., Rubio, R.
Regulation of Coronary Blood Flow.
Adv. Cardiol., 12, 303-374, 1974
- Berthon, B., Burgess, G.M., Capiod, I., Claret, M., Poggioli, J.
Mechanism of Action of Noradrenaline on the Sodium-Potassium-
Pump in Isolated Rat Liver Cells.
J. Physiol., 341, 25-40, 1983
- Betz, E., Brandt, H., Csornai, M., Heuser, D.
The Role of Ions in the Regulation of Pial Arteriol Diameters.
10th Dortmund Workshop: Pharmacology of Microcirculation.
Ed.: E.Leniger-Follert, D.W.Lübbers, in: Arzneim.-Forsch.
(Drug Res.) 26, 1230-1247, 1976
- Biedermann, M.
Das Verhalten der Membranpotentiale von Leberzellen der Ratte
während und nach Gefäßunterbindung.
Acta biol.med.germ., 21, 827-832, 1968
- Blackmore, P.F., Hughes, B.P., Shuman, E.A., Exton, J.H.
 α -adrenergic Activation of Phosphorylase in Liver Cells
Involves Mobilization of Intracellular Calcium Without Influx
of Extracellular Calcium.
J.Biol.Chem., 257, 190-197, 1982

Brown, A.M., Lew, V.L.

The Effect of Intracellular Calcium on the Sodium Pump of Human Red Cells.

J. Physiol., 343, 455-493, 1983

Brunner, M., Ellermann, R., Scheidt, W., Günther, H., Kessler, M.

DIG V1.3-A Software Package for Online Data Acquisition and Offline Processing: An Application for Hemodynamic Data.

Microvasc.Res., in Druck

Claret, M.

Transport of Ions in Liver Cells.

In: Membrane Transport in Biology, Vol. IVB, Ed.: G.Giebisch, D.C.Tosteson, H.H.Ussing, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 899-920, 1979

Claret, M., Mazet, J.L.

Ionic Fluxes and Permeabilities of Cell Membranes in Rat Liver.

J. Physiol., 223, 279-295, 1972

Claret, B., Claret, M., Mazet, J.L.

Ionic Transport and Membrane Potential of Rat Liver Cells in Normal and Low-Chloride Solutions.

J. Physiol., 230, 87-101, 1973

Clark, L.C.jr., Wolf, R., Granger, D., Taylor, Z.

Continuous Recording of Blood Oxygen Tension by Polarography.

J.Appl.Physiol., 6, 189, 1953

Coyer, P.E., Halsey, J.H., Strong, E.R.

Reversible and Irreversible Effects of pO_2 Alterations on Two Groups of APLYSIA Neurons.

Comp.Biochem.Physiol., 68A, 579-587, 1981

Dahl, G., Isenberg, G.

Decoupling of Heart Muscle Cells: Correlation with Increased Cytoplasmic Calcium Activity and with Changes of Nexus Ultrastructure. J. Membrane Biol., 53, 63-75, 1980

DeMello, W.C.

Influence of Intracellular Injection of H^+ on the Electrocatalytic Doubling in Cardiac Purkinje Fibres.

Cell Biol. Internat. Rep., 4, 51-58, 1980

Duling, B.R.

Microvascular Responses to Alterations in Oxygen Tension.

Circ.Res., 31, 481-489, 1972

Egashira, K.

Biphasic Response to Noradrenalin in the Guinea Pig Liver Cells.

Japanese J. Physiol., 30, 81-91, 1980

Exton, J.H.

Mechanisms Involved in α -Adrenergic Phenomena: Role of Calcium Ions in Actions of Catecholamines in Liver and other Tissues.

Am. J. Physiol., 238, E3-E12, 1980

Flagg-Newton, J., Loewenstein, W.R.

Experimental Depression of Junctional Membrane Permeability in Mammalian Cell Culture. A Study with Tracer Molecules in the 300 to 800 Dalton Range.

J. Membrane Biol., 50, 65-100, 1979

Frimmer, M., Kreh, W.

The Role of Oxidative and Glycolytic Metabolism in Cation Transport of Isolated Rat Liver Perfused with an Erythrocyte-Free Medium.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 268, 119-121, 1971

Gilbert, J.C., Sawas, A.H., Wyllie, M.G.

Stimulation and Inhibition of Synaptosome ATPases by Noradrenaline. The Involvement of Cytoplasmic Factor.

Arch. internat. Pharmacodyn. Therap., 245, 42-47, 1980

Gleichmann, U., Lübbers, D.W.

Die Messung des Sauerstoffdruckes in Gasen und Flüssigkeiten mit der Pt-Elektrode unter besonderer Berücksichtigung der Messung im Blut.

Pflügers Arch., 271, 431-455, 1960

Gorczynski, R.M., Duling, B.R.

Correlations Between pO_2 and Microvessel Diameter Changes During Functional Hyperemia of Striated Muscle.

In: Functional Hyperemia, Ed.: E.Leniger-Follert, D.W.Lübbers, M.Kessler, Arzneim.Forsch. (Drug Res.) 27, 1512-1513, 1977

Greenberg, S., Curro, F.A., Tanaka, T.P.

Regulation of Vascular Smooth Muscle of the Microcirculation.

In: The Physiology and Pharmacology of the Microcirculation, Vol. 1 Ed.: N.A.Mortillaro, Academic Press New York 1983, 39-141

Grote, J., Kreuscher, H., Vaupel, P., Günther, H.

The Effect of Arterial Hypoxia on Cerebral Oxygen Supply and Cerebral Metabolism during Acidosis.

In: Oxygen Supply, Eds.: M.Kessler, D.F.Bruley, L.C.Clark, D.W.Lübbers, I.A.Silver, J.Strauss, Urban&Schwarzenberg, München, 1973, 290-293

Haseloff, D.W., Hoffmann, H.-J.

Kleines Lehrbuch der Statistik

Walter DeGruyter & Co., Berlin 1968

Haylett, D.G., Jenkinson, D.H.

Effects of Noradrenaline on Potassium Efflux, Membrane Potential and Electrolyte Levels in Tissue Slices Prepared from Guinea Pig Liver.

J. Physiol., 225, 721-750, 1972a

Haylett, D.G., Jenkinson, D.H.

The Receptors Concerned in the Actions of Catecholamines on Glucose Release, Membrane Potential and Ion Movement in Guinea-Pig Liver.

J. Physiol., 225, 751-772, 1972b

Heyrovsky, J.

Polarographisches Praktikum.

Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1948

Heller, P., van der Kloot, W.

Transmembrane Potentials in Guinea-Pig Hepatocytes.

J. Physiol., 243, 577-598, 1974

Hoffmann, J.F.

Membrane Permeability and Volume Control of Human Red Blood Cells.

In: Development and Therapeutic Agents for Sickle Cell Disease, INSERM Symposium No. 9, Ed.: J.Rosa, Y.Beuzard, J.Hercules Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1979, 9-13

Höper, J., Kessler, M., Starlinger, H.

Preservation of ATP in the Perfused Liver.

In: Oxygen Transport to Tissue, Ed.: H.Bicher, D.Brüley, Plenum Publ. Corp., New York, Vol. 37A, 371-375, 1973

Höper, J., Kessler, M., Simon, W.

Measurements with Ion-Selective Electrodes (pK, pNa, pCa, pH) During No-Flow Anoxia.

In: Ion and Enzyme Electrodes in Biology and Medicine, Eds.: M.Kessler, L.C.Clark, D.W.Lübbbers, I.A.Silver, W.Simon, Urban&Schwarzenberg, München-Berlin-Wien, 1976, 331-334

Höper, J., Kessler, M.

Norepinephrine Induced Changes in Flow and Extracellular Activities of Na, K and Ca in Isolated Perfused Liver.

In: Theory and Application of Ion-Selective Electrodes in Physiology and Medicine, Eds.: D.W.Lübbbers, G.Eisenman, M.Kessler, W.Simon, Arzneim.Forsch. (Drug Res.) 28, 869-870, 1978a

Höper, J., Kessler, M.

Na-Dependency of Norepinephrine (NE) Induced Flow Changes in Isolated Perfused Rat Liver.

Fed. Proc. 37, 1978b

Höper, J. Kessler, M.

pO_2 and Sodium Dependent Mechanism Regulating Liver Blood Flow.

In: Adv. Physiol. Sci. Vol. 25. Oxygen Transport to Tissue
Eds.: A.G.B.Kovach, E.Dora, M.Kessler, I.A.Silver, Akademiai
Kiado, Budapest 1981, 163-164

Höper, J.; Kessler, M.

Constant-Pressure Perfusion of the Isolated Rat Liver: Local Oxygen Supply and Metabolic Function.

In Vorbereitung

Ji, S., Höper, J., Acker, H., Kessler, M.

The Effects of Low O_2 -Supply on the Respiratory Activity, Reduced Pyridine Nucleotide Fluorescence, K⁺-Efflux and the Surface pO_2 and pCO_2 of the Isolated Perfused Rat Liver.

In: Oxygen Transport to Tissue III, Eds.: I.A.Silver, M. Erecinska, H.I.Bicher, Plenum Publ. Corp., New York 1978, 545-552

Kessler, M., Lübbers, D.W.

Aufbau und Anwendungsmöglichkeiten verschiedener pO_2 -Elektroden. Pflügers Arch., 291, 82, 1966

Kessler, M., Grunewald, W.

Possibilities of Measuring Oxygen Pressure Fields in Tissue by Multiwire Platinum Electrodes.

Progr. Resp. Res., 3, 147-152, 1969

Kessler, M., Höper, J., Krumme, B.A.

Monitoring of Tissue Perfusion and Cellular Function.

Anesthesiology, 45, 184-197, 1976

Kessler, M., Lübbers, D.W., Krumme, B.A., Schoenleben, K.,
Buente, H.

Oxygen Tension in Different Tissues.

9th Europ. Conf. Microcirculation, Ed.: D.H. Lewis

Bibl. anat., 16, 146-149, 1977

Kessler, M., Höper, J., Ji, S.

Action of Norepinephrine on Microcirculation and pO_2
Distribution in the Isolated Perfused Rat Liver.

Gerontology, 24(Suppl.1), 55-65, 1978

Kessler, M., Höper, J.

Effects of Norm-Flow and No-Flow Anoxia on Cation Activities
and Energy Requirement of Liver tissue.

In: The Application of Ion-Selective Microelectrodes, Ed.:
T.Zeuthen Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1981a,
145-156

Kessler, M., Höper, J., Lübbers, D.W., Ji, S.

Local Factors Affecting Regulation of Microflow, O_2 Uptake
and Energy Metabolism.

In: Adv. Physiol. Sci. Vol. 25. Oxygen Transport to Tissue.
Eds.: A.G.B.Kovach, E.Dora, M.Kessler, I.A.Silver, Akademiai
Kiado, Budapest 1981b, 155-162

Kessler, M., Höper, J., Pohl, U.

Monitoring of Local pO_2 in Skeletal Muscle of Critically Ill
Patients.

In: Handbook of Critical Care, Eds.: J.L.Berk, J.E.Sampliner
Little, Brown and Company, Boston 1982, 599-609

Kessler, M., Höper, J., Harrison, D.K., Skolasinska, K.,
Klövekorn, W.P., Sebening, F., Volkholz, H.J., Beier, I.,
Kernbach, C., Rettig, V., Richter, H.

Tissue Oxygen Supply under Normal and Pathological Conditions.

In: Oxygen Transport to Tissue-V. Eds.: D.W.Lübbers, H.Acker,
E.Leniger-Follert and T.K.Goldstick, Plenum Press New York,
1984, 69-80

Knisely, M.H., Harding, F., Debacker, H.

Hepatic Sphincters.

Science, 125, 1023-1026, 1957

Kolb, H.-A., Adam, G.

Regulation of Ion Permeabilities of Isolated Rat Liver Cells
by External Calcium Concentration and Temperature.

J. Membrane Biol., 26, 121-151, 1976

Koo, A., Liang, I.Y.S.

β_2 -Adrenoceptors in Rat Liver Microcirculation.

Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., 6, 403-407, 1979a

Koo, A., Liang, I.Y.S.

Microvascular Filling Pattern in Rat Liver Sinusoids During
Vagal Stimulation.

J. Physiol., 295, 191-199, 1979b

Lambotte, L.

Hepatic Cell Membrane Potential: A New Assay for Preserved
Organs Viability.

Europ. surg. Res., 2, 241-250, 1970

Lambotte, L.

Effect of Activation of α and β Adrenergic Receptors on
the Hepatic Cell Membrane Potential in Perfused Dog Liver.

J. Physiol., 232, 181-192, 1973

Lassen, U.V., Pape, L., Vestergaard-Bogind, B.

Membrane Potential of Amphiuma Red Cells: Effect of Calcium.

In: Erythrocytes, Thrombocytes, Leucocytes, Eds.: E. Gerlach
et al. Thieme, 1973

Lawrence, T.S., Beers, W.H., Gilula, N.B.

Transmission of Hormonal Stimulation by Cell-to-Cell
Communication.

Nature, 272, 501-506, 1978

Leniger-Follert, E., Lübbers, D.W.

Behaviour of Microflow and Local pO_2 of the Brain Cortex
During and After Direct Electrical Stimulation.

Pflügers Arch., 366, 39-44, 1976

Leniger-Follert, E., Urbanics, R., Lübbers, D.W.

Behaviour of Extracellular H^+ and K^+ Activities During
Functional Hyperemia of Microcirculation in the Brain
Cortex.

Adv. Neurol., 20, 97-101, 1978

Loewenstein, W.R.

Permeability of Membrane Junctions.

Ann. N.Y. Acad. Sci., 137, 441-472, 1966

Loewenstein, W.R.

Cell-to-Cell Communication, Permeability, Formation, Genetics
and Functions of the Cell-to-Cell Membrane Channel. In:
Physiology of Membrane Disorders, Eds.: T.E.Andreotti, J.F.Hoffman
and D.D.Fanestil, Plenum Publishing Corp., New York, 1978, 335-356

Loewenstein, W.R., Kanno, Y., Socolar, S.J.

The Cell-to-Cell Channel.

Fed. Proc., 37, 2645-2650, 1978

Lübbers, D.W.

Gewebehypoxie und Durchblutung beim hämoglobinfrei perfundierten
Langendorff-Herzen des Meerschweinchens. In: Durchblutungsregu-
lation und Organstoffwechsel, Eds.: J.Grote, E.Witzleb, Mainz:
Akademie der Wiss. u. d. Literatur, Steiner, Wiesbaden, 1982,
11-18

Mazet, J.L., Claret, M., Claret, B.

The Passive Transport of Potassium in Rat Liver Cells.

J. Membrane Biol., 18, 335-350, 1974

McCuskey, R.S.

A Dynamic and Static Study of Hepatic Arterioles and Hepatic Sphincters.

Am. J. Anat., 119, 455-478, 1966

McLean, A.E.M.

Ion Transport in Rat Liver Slices.

Biochem. J., 87, 161-163, 1963

Meech, R.W.

The Sensitivity of *Helix aspersa* Neurons to Injected Calcium Ions.

J. Physiol., 237, 259-277, 1974

Miller, L.L., Bly, C.G., Watson, M.L., Ball, W.F.

The Dominant Role of the Liver in Plasma Protein Synthesis.

A direct Study of the Isolated Perfused Rat Liver with the aid of Lysine-E-C14.

J. Exp. Med., 94, 431, 1951

Nakas, M., Higashino, S., Loewenstein, W.R.

Uncoupling of an Epithelial Cell Membrane Junction by Calcium Ion Removal.

Science, 151, 89-91, 1966

Nestruck, A.C., Furneaux, R.W.

Cation Transport by Slices from the Isolated Perfused Rat Liver.

Can. J. Physiol. Pharmacol., 50, 276-278, 1971

Oliveira-Castro, G.M., Loewenstein, W.R.

Junctional Membrane Permeability: Effects of Divalent Cations.

J. Membr. Biol. 5, 51-77, 1971

Orozco, A., Sabelli, H.C.

The Effect of Catecholamines and Nicotine on the Transmembrane Potential of Frog Liver Cells.

Experientia, 26, 48, 1970

Penn, R.D.

Ionic Communication Between Liver Cells.

J. Cell Biol., 29, 171-173, 1966

Rappaport, A.M.

The Microcirculatory Hepatic Unit.

Microvasc. Res., 6, 212-228, 1973

Richardson, D.R., Johnson, P.C.

Changes in Mesenteric Capillary Flow during Norepinephrine Infusion.

Am. J. Physiol., 219, 1317-1323, 1970

Robenek, H., Herwig, J., Themann, H.

The Morphologic Characteristics of Intercellular Junctions between Normal Human Liver Cells and Cells from Patients with Extrahepatic Cholestasis.

Am. J. Pathol., 100, 93-114, 1980

Robenek, H., Themann, H., Ott, K.

Carbon Tetrachloride induced Proliferation of Tight Junctions in the Rat Liver as Revealed by Freeze-Fracturing.

Europ. J. Cell Biol., 20, 62-70, 1979

Romero, P.J., Whittam, R.

The Control by Internal Calcium of Membrane Permeability to Sodium and Potassium.

J. Physiol., 214, 481-507, 1971

Sayeed, M.M., Baue, A.E.

Na-K Transport in Rat Liver Slices in Hemorrhagic Shock.

Am. J. Physiol., 224, 1265-1270, 1973

Schanne, O., Corabeuf, E.

Potential and Resistance Measurements of Rat Liver Cells in situ.

Nature, 210, 1390-1391, 1966

Scholtholt, J.

Das Verhalten der Durchblutung der Leber bei Steigerung des Sauerstoffverbrauches der Leber.

Pflügers Arch., 318, 202-216, 1970

Schwarz, W., Passow, H.

Ca²⁺-Activated K⁺ channels in Erythrocytes and Excitable Cells.

Ann. Rev. Physiol., 45, 359-374, 1983

Sheridan, J.D., Finbow, M.E., Pitts, J.D.

Metabolic Interactions between Animal Cells Through Permeable Intercellular Junctions.

Exp. Cell. Res., 123, 111-117, 1979

Sherline, P., Lynch, A., Glinsmann, W.A.

Cyclic AMP and Adrenergic Receptor Control of Rat Liver Glycogen Metabolism.

Endocrinology, 91, 680-690, 1972

Shiba, Y., Muneoka, Y., Kanno, Y.

The Relation between Membrane Potential and ATP Content in Rat Liver during Ischemia.

Experientia, 34, 57-58, 1978

Sinagowitz, E., Rahmer, H., Rink, R., Görnandt, L., Kessler, M.

Local Oxygen Supply in Intra-Abdominal Organs and in Skeletal Muscle During Hemorrhagic Shock.

In: Oxygen Transport to Tissue, Eds.: H.Bicher, D.Brüley
Plenum Publ. Corp., New York, Vol. 37A, 1973, 505-511

Wands, J.

M.D. thesis, University of Washington, Seattle, 1969

zitiert aus Williams, J.A., J. theor. Biol., 28, 287-296, 1970.

Wiedemann, K., Weinhardt, F., Hamer, J., Wund, G., Berlet, H., Hoyer, S.

Einfluß von gleichzeitiger mäßiger arterieller Hypoxämie und mäßiger hypovolämischer Hypotension auf Gehirndurchblutung, Oxidativen und Energiestoffwechsel des Gehirns beim Hund. Anaesthesist, 28, 290-298, 1979

Williams, J.A.

Origin of Transmembrane Potentials in Non-exitable Cells. J. theor. Biol., 28, 287-296, 1970

Williams, J.A., Woodburry, D.M.

Determination of Extracellular Space and Intracellular Electrolytes in Rat Liver in vivo. J. Physiol., 212, 85-99, 1971

Williams, J.A., Withrow, C.D., Woodburry, D.M.

Effects of Nephrectomy and KCl on Transmembrane Potentials, Intracellular Electrolytes, and Cell pH of Rat Muscle and Liver in vivo. J. Physiol., 212, 117-128, 1971a

Williams, J.A., Withrow, C.D., Woodburry, D.M.

Effects of CO₂ on Transmembrane Potentials of Rat Liver and Muscle in vivo. J. Physiol., 215, 539-555, 1971b

Wu, P.H., Phillis, J.W.

Receptor-Mediated Noradrenaline Stimulation of (Na⁺-K⁺)ATPase in Rat Brain Cortical Homogenates. Gen. Pharmac. 10, 189-192, 1979

Yamaguchi, N., Garceau, D.

Correlations Between Hemodynamic Parameters of the Liver and Norepinephrine Release upon Hepatic Nerve Stimulation in the Dog. Can. J. Physiol. Pharmacol. 58, 1347-1355, 1980

Yancey, S.B., Nicholson, B.J., Revel, J.-P.

The Dynamic State of Liver Gap Junctions.

J. Supramol. Struct. Cell Biochem., 16, 221-232, 1981

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof.Dr.M.Kessler.
Die stimulierenden Diskussionen mit ihm trugen erheblich
zur Formulierung des Themas und zum Gelingen dieser
Arbeit bei.

Frau S.Dennerlein danke ich für die geduldige Ausführung
der Schreibarbeiten,
Frau G.Schuster für die graphische Gestaltung der Arbeit.
Herrn G.Kerl und Frau A.Kellermann danke ich für die
hervorragende technische Mitarbeit bei den Experimenten.
Herrn Dipl.Inf. M.Brunner danke ich für die Unterstützung
bei der Datenverarbeitung.

L e b e n s l a u f

=====

Am 15.Oktober 1947 wurde ich in Stockelsdorf als Sohn des Schneiders Carl Höper und seiner Ehefrau Adrienne, geb. Fick, geboren. Von 1954 bis 1960 besuchte ich die Volksschule in Stockelsdorf und anschließend den Aufbauzug der Volksschule in Stockelsdorf. Am 13.3.1964 verließ ich die Schule mit der Mittleren Reife.

Von 1964 bis 1965 war ich bei den Farbenfabriken Bayer, Wuppertal, als Biologielaborantenlehrling tätig.

Vom 1.10.1965 bis zum 21.9.1967 absolvierte ich eine Ausbildung als med.-techn.Assistent an der staatl. anerkannten Lehranstalt für med.-techn.Assistentinnen am Institut für Hygiene und med. Mikrobiologie der med.Akademie Lübeck. Im Anschluß an diese Ausbildung war ich vom 1.10.1967 bis zum 31.3.1968 als MTA-Praktikant und vom 1.4.1968 bis 31.1.1969 als med.-techn. Assistent am Institut für Hygiene und med.Mikrobiologie der med.Akademie Lübeck tätig. Danach wechselte ich zum Blutspendedienst des Deutschen Roten Kreuzes in Lütgensee, wo ich vom 1.2.1969 bis zum 31.3.1970 einer Tätigkeit als MTA nachging.

Am 7.3.1969 heiratete ich meine Frau Waltraud, geb.Kuhlmann.
Am 22.9. d.J. wurde unsere erste Tochter Britta geboren.

Am 1.4.1970 nahm ich eine Tätigkeit am Max-Planck-Institut für Systemphysiologie in Dortmund auf, wo ich bereits nach kurzer Zeit selbständig wissenschaftlich arbeitete.

Am 6.9.1971 wurde unser Sohn Dirk geboren. Im gleichen Jahr begann ich, mich auf die Prüfung für die Zulassung zum Hochschulstudium ohne Reifezeugnis vorzubereiten. Diese Prüfung legte ich mit Auszeichnung am 27.10.1973 in Bremen ab.

Im Wintersemester 1973/74 studierte ich an der Ruhr-Universität Bochum Chemie und vom Sommersemester 1974 bis zum Wintersemester 1981/82 Biologie. Am 18.12.1981 habe ich die Diplom-Hauptprüfung in Biologie bestanden.

Bis zum 31.7.1979 war ich weiterhin am Max-Planck-Institut in Dortmund tätig.

Am 25.2.1975 wurde unsere Tochter Ilka, am 16.4.1979 unser Sohn Birger geboren.

Seit dem 1.8.1979 bin ich am Institut für Physiologie und Kardiologie der Universität Erlangen-Nürnberg wissenschaftlich tätig.

Druck: Copy Center 2000
Obere Karlstraße 30
8520 Erlangen